

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2017년 12월 7일 (07.12.2017)



(10) 국제공개번호

WO 2017/209480 A2

(51) 국제특허분류:

미분류

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/005614

(22) 국제출원일:

2017년 5월 30일 (30.05.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0066095 2016년 5월 30일 (30.05.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사 켄백스앤카엘 (GEMVAX & KAEL

CO., LTD.) [KR/KR]; 34036 대전시 유성구 테크노1로 58, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김상재 (KIM, Sang Jae); 06360 서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호, Seoul (KR).

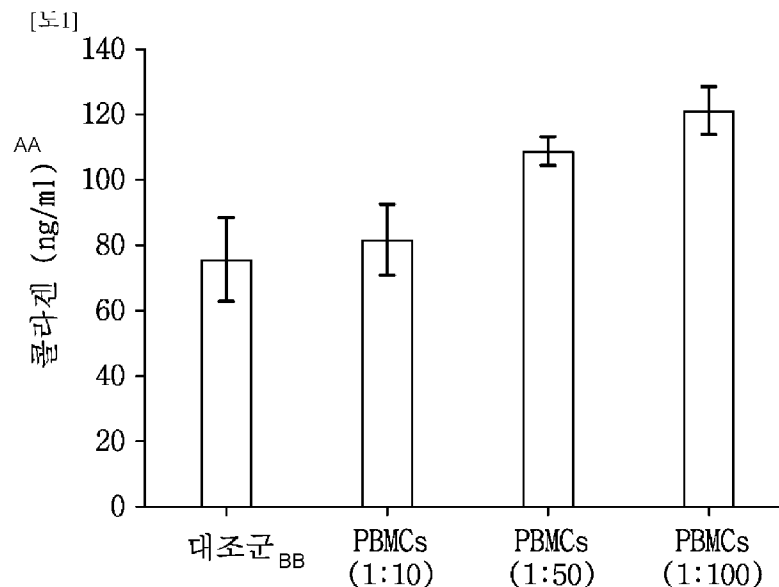
(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 03151 서울시 종로구 종로5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: COMPOSITION FOR SKIN REGENERATION AND AGING PREVENTION, COMPRISING PERIPHERAL BLOOD-DERIVED MONONUCLEAR CELLS AND PLATELET-RICH PLASMA, AND SKIN REGENERATION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장을 포함하는 피부재생 및 노화방지용 조성물 및 이를 이용한 피부 재생 방법



AA ... Collagen (ng/ml)

BB ... Control group

(57) Abstract: The present specification relates to a composition that regenerates the skin and prevents aging by increasing collagen synthesis, and a method for preventing skin regeneration by using the same. More specifically, the present specification relates to a composition for skin regeneration and aging prevention, which comprises platelet-rich plasma and peripheral blood-derived mononuclear cells and has the effect of increasing collagen synthesis. Also, the present specification relates to a skin regeneration method using the composition. The composition for skin regeneration and aging prevention according to one aspect of the present invention exhibits

[다음 쪽 계속]



WO 2017/209480 A2



럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

the effect of promoting collagen synthesis of the skin, thereby providing an excellent skin regeneration method.

(57) 요약서: 본 명세서는 콜라겐 합성을 증가시켜 피부를 재생하고 노화를 방지하는 조성물 및 이를 이용한 피부 재생방지 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 혈소판 농축 혈장 및 말초혈액 유래 단핵세포를 포함하며 콜라겐 합성을 증가시키는 효과를 지니는 피부 재생 및 노화방지용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 명세서는 상기 조성물을 이용한 피부 재생 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일측면에 따른 피부 재생 및 노화 방지용 조성물은 피부의 콜라겐 합성을 증진시키는 효과를 나타내어 우수한 피부 재생 방법을 제공할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장을 포함하는 피부재생 및 노화방지용 조성물 및 이를 이용한 피부 재생 방법

기술분야

- [1] 본 명세서는 피부를 재생하고 노화를 방지하는 조성물 및 이를 이용한 피부 재생 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 혈소판 농축 혈장 및 말초혈액 유래 단핵세포의 혼합물을 포함하여 콜라겐 합성을 증가시키고, 콜라겐을 분해시키는 효소인 콜라게나제를 저해하는 효과를 지니는 피부 재생 및 노화방지용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 명세서는 상기 조성물을 이용한 피부 재생 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세포외 기질(matrix)의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로서 세포외 간질에 존재한다. 또한, 생체 단백질 총 중량의 약 30%를 차지하는 중요한 단백질로서 견고한 3중 나선구조를 가지고 있다. 콜라겐은 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기물질의 대부분을 형성하는데, 특히 뼈와 피부(진피)에 그 포함량이 높다. 대부분의 다른 체 구조물에서는 섬유상 봉입체로서 존재한다.
- [3] 피부는 노화 과정으로 인하여 여러 가지 대사 활성이 저하되며, 총체적인 피부 세포의 활성도가 떨어진다. 따라서 이러한 노화로 인하여 콜라겐 생성능력, 콜라겐의 전사 이후에 일어나는 여러 과정에 변화가 일어나 콜라겐 생성의 감소로 이어지게 된다. 따라서 피부 주름의 발생 원인 중 하나로 피부 교원질(콜라겐)의 결핍을 들고 있다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부에 탄성과 탄력을 주며, 이들이 노화로 약해지면 피부는 쉽게 손상되고 늙는다.
- [4] 조직학적 관점에서 피부노화는 피부의 진피에서 매트릭스를 형성하는 세포외 조직(extracellular matrix proteins) 조성의 변화로 나타난다. 진피 세포외 조직 중 콜라겐 단백질들은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부적 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부 노화와 주름형성에 밀접한 관련이 있다.
- [5] 피부 노화에는 콜라게나제(MMP, Matrix metalloprotease, 기질 금속단백질 분해효소)라는 효소가 관여하는데 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포 외 기질의 합성과 분해는 적절하게 조절되거나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 콜라겐을 분해하는 효소인 콜라게나제(MMP)의 발현이 촉진되어 피부의 탄력이 저하되고 주름이 형성된다. 콜라게나제는 아연-의존적인 세포내 단백질 분해 효소로 진피의 세포외 구조의 성분들을 분해시키거나 재구조화시킬 수 있는 물질로서, 그 중 MMP-1은 진피의 콜라겐에 작용하여 분절시킨다.

- 따라서 이 효소의 합성 양과 활성도의 조절이 주름에 중요한 요인으로 작용한다.
- [6] 피부 주름 개선 물질로 가장 대표적인 것이 레티놀 (retinol)과 레티노이드라고 명명되는 그 유도체들로서, 건선, 노화, 암, 여드름 등 다방면에서 좋은 효과를 나타낸다고 알려져 있다 또한 이 레티노이드는 피부에 도포하였을 때 콜라게나제 (MMP-1)을 저해함으로써 콜라겐의 손실을 방지하고 콜라겐 형성을 자극함으로써 내인성 및 광노화를 방지하고 회복시키는 것으로 알려져 있다. 하지만, 이러한 효과에도 불구하고 피부에 도포하였을 때 홍반, 가려움, 건선, 스케일링 등의 국소적 피부자극 반응을 일으킨다고 알려져 있다. 따라서 생체에 안전하고 기존의 물질보다 콜라게나제 (MMP-1)를 억제하고 콜라겐 합성능이 좋은 새로운 주름개선 물질 개발이 요구되고 있다.
- [7] 혈소판 농축 혈장(PRP, Platelet Rich Plasma)은 혈소판이 풍부한 혈장을 의미한다. 혈액을 뽑아 원심분리기를 이용하여 분리하였을 때 분리된 혈장 하단부의 혈소판이 가장 풍부하게 함유된 부분을 말한다. 혈소판 농축 혈장 자가혈 피부재생술은 원래 상처 재생에 사용되던 시술로 자신의 혈액을 이용하여 노화된 피부를 재생시켜 주는 시술이다. 분리된 혈장 하단부의 혈소판에는 PDGF, FGF 등 성장인자가 풍부하여 세포증식, 콜라겐 생산, 히알루론산 생산, 상피세포 성장 촉진, 혈관신생, 상처치유를 촉진하는 효과가 있다는 가정하에 두피에 피내 주사를 하거나 스킨 롤러(skin roller)를 사용하여 미세한 구멍을 만들어 도포하여 치료한다. 또한, 혈소판 농축 혈장은 임플란트 및 상악동 거상술 (sinus elevation)의 상처치료 촉진, 심장수술, 정형수술, 피부의학 (만성창상)을 포함한 다양한 치료 및 미용 분야에 이용될 수 있다. 혈소판이 풍부한 혈장이 되도록 자신의 혈액을 특수 처리하는 혈소판 농축 혈장은 자신의 혈액속에 있는 혈소판 내 성장인자가 피부속 줄기세포를 활성화시켜 콜라겐 등의 탄성 섬유를 재생해 투명하고 부드러우면서도 탄력있는 피부결로 되돌려주고 노화가 천천히 진행되게 도와준다.
- [8] 국제공개특허 제2005/065269호에는, 혈소판 농축 혈장 및 피부치료용 섬유아세포를 포함한 다양한 조성물, 특히, 예를 들어 주름의 생성을 줄이기 위해 피부에 피부학적 가용 매개체인(dermatologically acceptable carrier) 혈소판 농축 혈장의 반복적인 투여에 관해 개시되어 있다.
- [9] 단핵세포는 골수에서 생성되어 혈류로 방출되고 새로 형성된 단핵세포는 말초 혈액으로 이동하고, 순환 단핵세포는 말초 혈관의 상피 세포에 부착하여 다양한 조직내로 이동할 수 있으며 미성숙 수지상세포 또는 대식세포 (macrophage)로 분화될 수 있다. 단핵세포는 기원세포에 따라 말초혈액유래 단핵세포, 골수유래 단핵세포 또는 지방유래 단핵세포가 있다. 말초혈액단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell, 말초혈액단핵구, PBMC)는 혈액 내 존재하는 구형 핵을 가진 세포를 의미한다. 단핵세포에는 B 세포, T 세포, 대식세포 (macrophage), 수지상 세포 (dendritic cell), 자연살해세포 (NK cell, natural killer cell)등의 면역세포들이 포함되어 있으며, 최근 이러한 면역세포들의 기능을 활용하여 질병에 대한 예방

및 치료를 위한 치료제로 이용하고자 하는 연구들이 이루어지고 있다. 실제로, 최근 암 등의 질환을 치유하고자 자가 유래의 말초혈액 내 면역세포를 이용한 세포치료제 개발 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이미 품목허가를 받은 면역세포치료제도 늘어나고 있는 추세이다. 하지만, 자가 유래된 말초혈액단핵세포를 이용하여, 콜라겐 합성을 증가시키고 피부 재생을 향상시키고자 하는 방법에 대해서는 알려진 바가 없다.

- [10] 혈소판 농축 혈장을 포함한 피부 치료 또는 화장품 조성물은 피부 재생 효과가 널리 알려져 있으나 콜라겐 합성을 획기적으로 증대시켜 피부 재생 및 노화를 방지하는 방법에 대한 새로운 수요가 있으며, 이에 혈소판 농축 혈장 외에 추가로 세포를 포함하는 조성물을 개발 하고자 하는 연구가 진행 중이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 이러한 배경하에서 본 발명자들은 혈소판 농축 혈장 (PRP) 및 말초혈액 유래 단핵세포 (PBMC)를 모두 포함하는 혼합 조성물이 콜라겐 합성을 증대시켜 피부 재생 및 노화방지 효능이 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [12] 본 발명의 목적은 일 측면에서, 혈소판 농축 혈장을 포함하는 기존의 조성물 보다 콜라겐 합성 효과가 우수한 피부 재생 및 노화 방지 조성물을 제공하는데 있다. 또한 이를 이용한 피부 재생 방법을 제공하고자 하는데 있다.

과제 해결 수단

- [13] 본 발명은 일 측면에서, 말초혈액 유래 단핵세포 (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell)를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물을 제공한다.
- [14] 본 발명은 다른 측면에서, 말초혈액 유래 단핵세포와 함께 혈소판 농축 혈장을 추가로 포함하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명은 다른 측면에서, 피부 재생 및 노화방지용 조성물의 제조에 사용하기 위한, 말초혈액 유래 단핵세포, 혈소판 농축 혈장, 또는 이들의 조합의 용도를 제공한다.
- [16] 본 발명은 다른 측면에서, 피부 재생 및 노화방지를 위한 말초혈액 유래 단핵세포, 혈소판 농축 혈장, 또는 이들의 조합을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 다른 측면에서, 피부 재생 및 노화방지를 위한 유효성분으로서 말초혈액 유래 단핵세포, 혈소판 농축 혈장, 또는 이들의 조합의 비치료적 화장 용도를 제공한다.
- [18] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 인간 말초혈액 유래 단핵 세포는 전혈로부터 추출되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 말초혈액 유래 단핵세포는 자가 세포인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 혈소판 농축 혈장은 자가

혈액에서 유래된 것을 특징으로 할 수 있다.

- [21] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 혈소판 농축 혈장은 5배 이상 농축되어 혈소판 농도가 $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ 내지 $5 \times 10^6/\mu\text{l}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물에 있어서, 상기 조성물은 콜라겐의 합성을 증대시키거나 콜라게나제 활성을 저해하는 것을 것을 특징으로 할 수 있다.
- [23] 본 발명은 다른 측면에서, 상기 조성물을 피부에 적용하는 단계를 포함하는 피부 재생 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 측면에 따른 피부 재생 방법에 있어서, 상기 피부에 적용하는 단계는 피부에 도포, 미세 천공, 온열 적용 중 하나 이상의 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [25] 본 발명은 또 다른 측면에서, 밀도구배 원심 분리법을 통해 인간 말초혈액 유래 단핵세포를 분리하고, 인산염완충용액으로 세척하여 말초혈액 유래 단핵세포(PBMC)를 분리하는 단계; 전혈을 원심분리하여 혈장 성분인 상등액을 회수하고, 회수된 상등액을 원심분리하여 혈소판 결핍 혈장 (PPP, Platelet Poor Plasma) 부분을 회수하고, 나머지 부분을 재부유하여 농축된 혈소판 농축 혈장 (PRP)을 제조하는 단계; 및 말초혈액 유래 단핵세포를 혈소판 농축 혈장에 부유시키는 단계를 포함하는, 피부 재생 및 노화 방지용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [26] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 제조방법에서, 상기 혈소판 농축 혈장은 정상 혈소판 농도에 비해 5배 이상 농축된 혈소판 농도를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [27] 본 명세서에 따른 혈소판 농축 혈장 및 말초혈액 유래 단핵세포를 포함하는 조성물은 콜라겐 합성 증대 효과 및 콜라겐분해 효소 저해 효과를 가져 우수한 피부 재생 방법을 제공할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 인산염 완충용액으로 부유된 말초혈액 유래 단핵세포를 인간 섬유아세포 수 대비 1:10, 1:50, 1:100의 세포수 비율로 인간 섬유아세포와 혼합 배양한 것의 콜라겐 합성 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 2는 혈소판 농축 혈장으로 부유된 말초혈액 유래 단핵세포를 인간 섬유아세포 수 대비 1:10, 1:50, 1:100의 세포수 비율로 인간 섬유아세포와 혼합 배양한 것과 혈소판 농축 혈장과 인간 섬유아세포를 혼합 배양한 것을 비교하여 콜라겐 합성 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 3은 혈소판 농축 혈장으로 부유된 말초혈액 유래 단핵세포를 인간 섬유아세포 수 대비 1:10, 1:50, 1:100의 세포수 비율로 인간 섬유아세포와 혼합 배양한 것의 콜라게나제(MMP-1) 활성 억제 정도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 명세서는 단핵세포, 예를 들어, 말초혈액유래 단핵세포를 포함하고, 추가로 혈소판 농축 혈장 (PRP, Platelet Rich Plasma)을 포함하는 조성물을 제공한다 본 명세서의 조성물은 피부 재생 및 노화 방지에 유용하다. 본 명세서의 단핵세포로는 바람직하게는 말초혈액유래 단핵세포가 이용될 수 있다.
- [32] 아울러, 본 명세서는 밀도구배 원심 분리법을 통해 인간 말초혈액 유래 단핵세포를 분리하고, 인산염완충용액으로 세척하여 말초혈액 유래 단핵세포 (PBMC)를 분리하는 단계; 전혈을 원심분리하여 혈장 성분인 상등액을 회수하고, 회수된 상등액을 원심분리하여 혈소판 결핍 혈장 (PPP, Platelet Poor Plasma) 부분을 회수하고, 나머지 부분을 재부유하여 농축된 혈소판 농축 혈장 (PRP)을 제조하는 단계; 및 말초혈액 유래 단핵세포를 혈소판 농축 혈장에 부유시키는 단계를 포함하는, 피부 재생 및 노화 방지용 조성물의 제조방법을 제공한다. 바람직하게는, 혈소판 농축 혈장은 정상 혈소판 농도에 비해 5배 이상 농축된 혈소판 농도를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [33] 단핵세포는 급성 및 만성 염증을 매개하고, 식균 작용 및 피브린 분해작용에 의해 손상된 조직의 복구를 촉진하고, 혈관 생성 (혈관 형성)을 유도하고, 세포외 매트릭스 생성을 조절한다. 본 발명의 일 측면에 의한 조성물에서는 골수 유래, 지방 유래 또는 말초혈액유래 단핵세포를 사용할 수 있고, 바람직하게는 말초혈액유래 단핵세포를 포함한다. 본 발명의 일 측면에 의한 조성물은 콜라겐 합성을 획기적으로 증대시켜 피부 재생 및 노화 방지의 효과를 나타낸다.
- [34] 혈소판 농축 혈장 (PRP, Platelet rich plasma)은 혈소판 농축물로, 정상적으로 혈액에서 발견되는 혈소판 농도보다 높은 수준의 혈소판을 포함한다. 예를 들어, 혈소판 농도가 정상 혈액에서의 농도보다 2배, 5배, 10배 또는 100배 또는 그 이상이다. 바람직하게는, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물에 포함되는 혈소판 농축 혈장은 5배 이상으로 농축된 것이다. 혈소판 농축 혈장은 혈소판 이외의 요소로 혈장, 성장인자, 백혈구 세포 등을 포함한다. 혈소판 농축 혈장은 다양한 동물로부터 수득할 수 있으며, 바람직하게는 인간으로부터 얻는다. 혈소판 농축 혈장은 자가조직 (autologous) 또는 동종조직 (allogenic)으로부터 얻을 수 있으나, 바람직하게는 자가조직으로부터 수득한다.
- [35] 본 발명의 일 측면에 따른, 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장의 투여량은 세포 수를 기준으로, 투여 대상 피부의 섬유아세포 수 : 상기 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장의 세포 수의 비율 범위가 1:8이상, 1:10이상, 1:15이상, 1:20이상, 1:30이상, 1:40이상, 1:50이상, 1:70이상, 1:80이상, 1:100이상, 또는 1:110이상일 수 있다. 다른 측면에서 상기 비율 범위는 1:120이하, 1:110이하, 1:100이하, 1:80이하, 1:70이하, 1:50이하, 1:40이하, 1:30이하, 1:20이하, 1:15이하, 또는 1:10이하일 수 있다. 바람직하게는 상기 비율 범위는 1:10 내지 1:100일 수 있다.

- [36] 본 발명에 따른 조성물은 약학 조성물, 화장품 조성물, 식품 조성물 등이 될 수 있다. 또한, 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.
- [37] 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 경구, 직장, 경피, 피내, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 골수 내, 경막 내 또는 피하 등으로 투여될 수 있다.
- [38] 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡셀제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탁제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 젤, 크림, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [39] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [40] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10g/kg/일, 구체적으로는 0.1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 1g/kg/일, 더 구체적으로는 0.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 100 mg/kg/일이 될 수 있으나, 용량에 따른 효과의 차이를 보이는 경우 이를 적절히 조절할 수 있다. 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 1일 1회 내지 3회 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 본 발명의 일 측면에 따른 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 측면에 따른 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하여 사용하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 낙농제품, 비타민 복합제, 음료수, 차, 드링크제 등이 있으나, 이제 제한되는 것은 아니며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 또한, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다.
- [42] 본 발명의 일 측면에 따른 화장품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 아이크림, 영양크림, 맛사지크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 파우더, 에센스, 팩 등의 제형을 가질 수 있다.
- [43] 본 발명의 일 측면에 따른 화장품 조성물은 통상의 화장품 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 화장품 조성물은 상기 말초혈액

유래 단핵세포 및/또는 혈소판 농축 혈장을 함유하는 항장 제품, 화장수, 크림, 로션 등의 형태로 제조될 수 있으며, 이는 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.

[44] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 분말제, 액제, 고형 제제, 주사제 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[45] 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게는 0.1% 이상, 최대 약 20%, 바람직하게는 최대 약 5% 및 더 바람직하게는 최대 1% (w/w)로 말초혈액 유래 단핵세포 및/또는 혈소판 농축 혈장을 함유한다. 적당한 농도의 선택은 예를 들어 바람직한 투여량, 빈도 및 활성 성분의 전달의 방법과 같은 인자들에 의존적이다.

[46] 본 명세서는 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하, 본 발명의 일 측면을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 일 측면을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[47] 본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).

[48] 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이며, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.

[49] 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 실시예에 필수적인 것으로 해석되어서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한,

본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

[50] 본 발명의 바람직한 구체예들은 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 최적의 모드를 포함한다. 바람직한 구체예들의 변이들이 앞선 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 그러한 변이를 적절히 이용하길 기대하고, 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 다른 방식으로 본 발명이 실시되기를 기대한다. 따라서, 본 발명은, 특허법에 의해 허용되는 것과 같이, 첨부된 특허청구범위에서 언급된 발명의 요지의 균등물 및 모든 변형들을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변이들 내에서 상기 언급된 구성요소들의 어떤 조합이라도 여기서 반대로 명시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 본 발명에 포함된다. 본 발명은 예시적인 구체예들을 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기술되었지만, 당업자들은 하기 청구범위에 의해 정의되는 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서도 형태 및 디테일에서 다양한 변화가 행해질 수 있음을 잘 이해할 것이다.

[51] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[52] [실시예 1]

[53] 실험의 재료 및 방법

[54] 섬유아세포 배양

[55] ATCC로부터 얻은 인간 섬유아세포 (human fibroblast, CCD-986sk)를 DMEM/High modified (Hyclone) 배지에 10% FBS (Gibco), 1% Penicillin streptomycin (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 Trypsin-EDTA 용액 (Gibco)을 이용하여 1:2 혹은 1:3으로 계대 배양한 후에 3~5 세대 세포를 실험에 이용하였다.

[56]

[57] 말초혈액 유래 단핵세포 분리

[58] 인간 말초혈액 유래 단핵세포 (human peripheral blood mononuclear cells, hPBMC)는 전혈 10 ~ 100 cc로부터 추출하였다. 시약 Lymphoprep 혹은 Ficoll-Paque를 이용한 밀도구배 원심 분리법을 통해 인간 말초혈액 유래 단핵세포를 분리하고, 인산염완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척한 후에 실험에 이용하였다.

[59]

[60] 혈소판 농축 혈장 (PRP, Platelet Rich Plasma) 제조

[61] 전혈 10 ~ 100 cc을 150g ~ 200g의 속도로 5분 ~ 10분간 원심 분리하여 혈장 성분인 상등액을 회수한다. 회수된 상등액을 800g ~ 1000g의 속도로 10분 ~

15분간 원심 분리하여 약 1/3 부위의 혈소판 결핍 혈장 (PPP, Platelet Poor Plasma)를 회수하고, 나머지 2/3를 재부유하여 혈소판 농축 혈장으로 제조하여 실험에 이용하였다. 혈액 내 정상 혈소판 농도는 $1.5 \sim 4 \times 10^5/\mu\text{l}$ 이며, 혈소판 농축 혈장은 5배 이상 농축된 것을 말한다. 본 실험에서는 $1 \sim 5 \times 10^6/\mu\text{l}$ 를 사용하였다.

[62]

[63] [실시예 2]

[64] 말초혈액 유래 단핵세포만 처리 했을 때보다 혈소판 농축 혈장을 함께 처리하였을 때 섬유아세포에서 콜라겐 합성이 증대되는 것을 알아보기 위하여 각각의 실험을 진행하였다.

[65] 인간 섬유아세포를 6-well plate에 $6 \times 10^4/\text{well}$ 을 넣고 16~18시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 인산염완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척하였다. 인간 말초혈액 유래 단핵세포를 인산염완충용액 또는 혈소판 농축 혈장 (PRP)으로 부유하고, 6-well plate에서 배양된 인간 섬유아세포와에 PBS+PBMC 또는 PRP+PBMC 혼합물을 1:10, 1: 50, 1:100의 [세포수] 비율로 24시간 혼합 배양하였다. 인간 섬유아세포가 분비한 배양액을 수거하여 콜라겐 양을 ELISA (Procollagen type I peptide EIA kit, Takara) 방법을 이용하여 측정하였다. ELISA 방법은 Antibody-POD conjugated solution $100 \mu\text{l}$ 를 96-well에 넣은 다음 37°C 에서 3시간 배양한다. Well에서 배양액을 제거하고 인산염완충용액으로 3회 세척한 후에 발색시약 (TMBZ) $100 \mu\text{l}$ 를 넣고 상온에서 15분간 배양한 다음 1N 황산 $100 \mu\text{l}$ 를 넣은 다음 450 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

[66] 인산염완충용액으로 부유된 말초혈액 유래 단핵세포를 1:10, 1:50, 1:100의 세포수 비율로 6-well plate에서 배양된 인간 섬유아세포와 혼합 배양한 결과, 대조군에 비해 말초혈액 유래 단핵세포 농도 증가에 따라 (dose-dependent)로 인간 섬유아세포의 콜라겐 합성이 각각 8%, 44%, 60%로 증가되었다(도 1 참조).

[67] 혈소판 농축 혈장으로 부유된 말초혈액 유래 단핵세포의 혼합 처리군을 인간 섬유아세포와 1:10, 1:50, 1:100의 세포수 비율로 혼합 배양한 결과, 혈소판 농축 혈장 단독 처리군 보다 혈소판 농축 혈장과 말초혈액 유래 단핵세포 혼합 처리군이 인간 섬유아세포의 콜라겐 합성 증가를 각각 22%, 33%, 46%로 더 유도하였다. 또한, 콜라겐 합성 증가는 혼합 처리군의 말초혈액 유래 단핵세포 농도가 증가함에 따라 (dose-dependent) 증가되었다(도 2 참조).

[68]

[69] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 섬유아세포의 콜라겐 합성을 증대시키는 활성을 보이는 것을 알 수 있다. 이를 통하여 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 콜라겐 합성을 통한 피부 재생 및 노화 방지 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

[70]

- [71] [실시예 3]
- [72] 말초혈액 유래 단핵세포와 혈소판 농축 혈장에 의한 콜라게나제 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 활성 억제 효과
- [73]
- [74] 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장의 혼합물이 콜라겐을 분해시켜 콜라겐 농도를 감소시키는 것으로 알려진 콜라게나제(MMP-1)의 활성을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위하여, 실험을 진행하였다.
- [75] 인간 섬유아세포를 6-well plate에 6×10^4 /well을 넣고 16~18시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 인산염완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척하였다. 인간 말초혈액 유래 단핵세포를 인산염완충용액 또는 혈소판 농축 혈장 (PRP)으로 부유하고, 6-well plate에서 배양된 인간 섬유아세포와에 PBS+PBMC 또는 PRP+PBMC 혼합물을 1:10, 1: 50, 1:100의 세포수 비율로 24시간 혼합 배양하였다. 인간 섬유아세포가 분비한 배양액을 수거하여 콜라게나제 양을 ELISA (Human MMP-1 ELISA kit, RayBiotech) 방법을 이용하여 측정하였다. ELISA 방법은 Antibody-Human MMP-1으로 코팅된 96-well에 1/2로 희석된 배양액 및 표준액을 각 $100 \mu\text{l}$ 를 넣고 상온에서 2.5시간 반응시킨 다음 세척용 완충액 $400 \mu\text{l}$ 로 4회 세척한다. Biotinylated anti-Human MMP-1 $100 \mu\text{l}$ 를 96-well에 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후에 세척용 완충액 $400 \mu\text{l}$ 로 4회 세척한다. 그 후에 HRP-Streptavidin 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 96-well에 넣고 45분간 반응시킨 다음 세척용 완충액 $400 \mu\text{l}$ 로 4회 세척한다. 마지막으로 발색시약 (TMB) $100 \mu\text{l}$ 를 넣고 상온에서 30분간 배양한 다음 0.2N 황산 $50 \mu\text{l}$ 를 넣은 후에 450 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.
- [76] 혈소판 농축 혈장으로 부유된 말초혈액 유래 단핵세포 혼합 처리군을 6-well plate에서 배양된 인간 섬유아세포와 1:10, 1:50, 1:100의 비율로 혼합 배양한 결과, 혈소판 농축 혈장 단독 처리군 보다 혈소판 농축 혈장과 말초혈액 유래 단핵세포 혼합 처리군이 인간 섬유아세포의 콜라게나제 (MMP-1)의 활성을 각각 2.7%, 4.5%, 4.8%씩 더 억제하는 것으로 나타났다 (도 3 참조).
- [77]
- [78] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 섬유아세포에서 조직을 붕괴시키는 콜라게나제 (MMP-1)의 활성을 저해하는 활성을 보이는 것을 알 수 있다. 이를 통하여 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 피부 조직의 재생 효과 및 노화 방지 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.
- [79]
- [80] 상기 실험 예들의 결과를 종합하여 보면, 본 발명의 일 측면에 따른 혈소판 농축 혈장 및 말초혈액 유래 단핵세포를 포함하는 조성물은 콜라겐 합성 증대 효과 및 콜라게나제 활성 저해 효과를 가짐을 알 수 있으며, 이를 이용하여 피부 조직의 재생 및 노화방지의 효과를 가져와 피부 재생 방법 및 피부 재생용 약품 또는 화장품 등의 개발을 가능하게 할 수 있을 것으로 판단된다.

청구범위

- [청구항 1] 말초혈액 유래 단핵세포 (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) 및 혈소판 농축 혈장 (PRP, Platelet Rich Plasma)을 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 말초혈액 유래 단핵세포는 인간 말초혈액 유래 단핵세포인 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 인간 말초혈액 유래 단핵 세포는 전혈로부터 추출되는 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서, 상기 인간 말초혈액 유래 단핵세포는 자가 세포인 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 혈소판 농축 혈장은 자가 혈액에서 유래된 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장의 투여량은 세포 수를 기준으로, 투여 대상 피부의 섬유아세포 수: 상기 말초혈액 유래 단핵세포 및 혈소판 농축 혈장의 세포 수의 비율 범위가 1: 8 내지 1: 120 이 되는 양인, 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 혈소판 농축 혈장은 5배 이상 농축되어 혈소판 농도가 $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ 내지 $5 \times 10^6/\mu\text{l}$ 인 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 콜라겐의 합성을 증대시키거나 콜라게나제 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 경피, 피내, 피하, 근육내, 또는 혈관으로 투여되는 것인, 피부 재생 및 노화방지용 조성물.
- [청구항 10] 제 1항 내지 9항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 피부에 적용하는 단계를 포함하는 피부 재생 방법.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 피부에 적용하는 단계는 피부에 도포, 미세 천공, 온열 적용 중 하나 이상의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 재생 방법.
- [청구항 12] (a) 밀도구배 원심 분리법을 통해 인간 말초혈액 유래 단핵세포를 분리하고, 인산염완충용액으로 세척하여 말초혈액 유래 단핵세포 (PBMC)를 분리하는 단계;
 (b) 전혈을 원심분리하여 혈장 성분인 상등액을 회수하고, 회수된 상등액을 원심분리하여 혈소판 결핍 혈장 (PPP, Platelet Poor Plasma) 부분을 회수하고, 나머지 부분을 재부유하여 농축된 혈소판 농축 혈장 (PRP)을 제조하는 단계; 및
 (c) 말초혈액 유래 단핵세포를 혈소판 농축 혈장에 부유시키는 단계

- 를 포함하는, 피부 재생 및 노화 방지용 조성물의 제조방법.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 혈소판 농축 혈장은 정상 혈소판 농도에 비해 5배 이상 농축된 혈소판 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 피부 재생 및 노화 방지용 조성물의 제조방법.
- [청구항 14] 피부 재생 및 노화방지용 조성물의 제조에 사용하기 위한, 말초혈액 유래 단핵세포, 혈소판 농축 혈장, 또는 이들의 조합의 용도.
- [청구항 15] 피부 재생 및 노화방지를 위한 말초혈액 유래 단핵세포, 혈소판 농축 혈장, 또는 이들의 조합.
- [청구항 16] 피부 재생 및 노화방지를 위한 유효성분으로서 말초혈액 유래 단핵세포, 혈소판 농축 혈장, 또는 이들의 조합의 비치료적 화장 용도.

