(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0034331
(43) 공개일자 2020년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/23 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/23 (2013.01)
A61K 8/4986 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0113998
(22) 출원일자 2018년09월21일
심사청구일자 2018년09월21일

(71) 출원인
메디포스트(주)
경기도 성남시 분당구 대왕판교로644번길 21 (삼평동)
(72) 발명자
양윤선
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 644번길 21 (삼평동)
오원일
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 644번길 21 (삼평동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 아이피에스

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **피부 세포 활성화용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

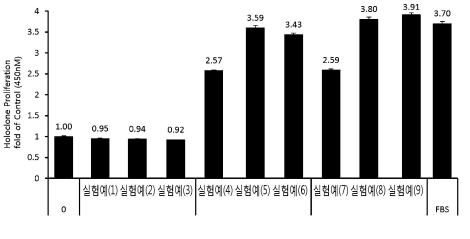
본 명세서는 피부 줄기세포 활성화용 조성물에 관한 것에 관한 것으로, 상기 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(lipoic acid) 중 하나 이상의 구성요소를 포함할 수 있다.

본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 피부 세포의 활성화 효과가 나타날 수 있으며, 상기 피부세포는 피부 줄기세포일 수 있다.

상기 피부 줄기세포 활성화에 의해 줄기세포 증식 및/또는 분열이 활발하게 일어나고, 궁극적으로 노화된 피부가 재생될 수 있다.

또한, 상기 조성물에 의해 피부 미백 효과도 나타날 수 있다.

대 표 도



α-Lipoic	FeSO4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(1)
	50uM	실험예(2)
	100uM	실험예(3)
200uM	0.5uM	실험예(4)
	50uM	실험예(5)
	100uM	실험예(6)
400uM	0.5uM	실험예(7)
	50uM	실험예(8)
	100uM	실험예(9)

[표4]

(52) CPC특허분류
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
(72) 발명자
이장영
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 644번길 21 (삼평동)
최수진
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 644번길 21 (삼평동)
전은수
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 644번길 21 (삼평동)
오현아
경기도 성남시 분당구 대왕판교로 644번길 21 (삼평동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

황산철(Ferrous sulfate);및

리포산(Lipoic acid) 또는 그의 염;을

포함하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate)은 황산 제1철(황산철(II); $FeSO_4$)인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 황산 제1철(황산철(II); $FeSO_4$)은 무수염($FeSO_4$), 4수염($FeSO_4 \cdot 4H_2O$), 5수염($FeSO_4 \cdot 5H_2O$), 6수염($FeSO_4 \cdot 6H_2O$) 및 7수염($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 중 어느 하나 이상을 포함하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 리포산(Lipoic acid)은 알파리포산(α-Lipoic acid) 또는 베타리포산(β-Lipoic acid)인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 알파리포산(α-lipoic acid)은 (R)-(+)- 알파리포산((R)-(+)-α-lipoic acid), (S)-(-)-알파리포산((S)-(-)-α-lipoic acid) 또는 이들의 혼합물인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate)은 0.5μM 내지 500μM;이며

상기 리포산(Lipoic acid)은 0.5μM 내지 500μM인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate)은 0.5μM 내지 200μM;이며

상기 리포산(Lipoic acid)은 100μM 내지 500μM인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate)은 0.5μM 내지 200μM;이며

상기 리포산(Lipoic acid)은 200μM 내지 500μM인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate)은 0.5μM 내지 60μM;이며

상기 리포산(Lipoic acid)은 200μM 내지 400μM인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)이 1:1 내지 1:10 몰농도 비율로 포함된 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)이

1:4 내지 1:8 몰농도 비율로 포함된 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 피부는 진피(Derma) 또는 표피(Epiderma)인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 세포는 완전히 분화된 세포(Fully differentiated cell). 전구세포(Progenitor cell) 또는 줄기세포(Stem cell)인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

아미노산, 당류, 비타민, 무기염류, 지질, 사이토카인(Cytokine), 성장인자(Growth factor), 세포 외 기질 단백질, 배지, 항산화 물질, 멜라닌 색소 합성 억제 물질, 멜라닌 색소를 포함하는 세포에 작용하는 독성물질 및 각

질 박리 물질 중 하나 이상을 추가적으로 더 포함하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 조성물은 동물 유래 혈청을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 동물 유래 혈청은 FBS(Fetal Bovine Serum)인 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 조성물은 하기의 기능 중 하나 이상을 가지는 피부 세포 활성화용 조성물:

i) 세포 증식효과 기능;

ii) 세포 재생 기능;

iii) 세포 노화 조절자 발현 억제 기능; 및

iv) 미백 기능.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 노화 조절자는 CDK(Cyclic-dependent Kinase) 억제제인 것을 특징으로 하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 CDK(Cyclic-dependent Kinase) 억제제는 P21, P27, P57, P16, P15, P18, P19, P53 및 p-P53 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포 배양을 위한 배지 형태인 것을 특징으로 하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 세포 배양을 위한 배지는 글라이신(Glycine), 알지닌(L-Arginine), 글루타민(L-Glutamine), 글루타믹애씨드(L-Glutamic Acid), 아스파라진(L-Asparagine-H20), 알라닌(L-Alanine), 아스파틱애씨드(L-Aspartic acid),

시스테인에이치씨엘(L-Cysteine hydrochloride-H20), 히스티딘(L-Histidine), 이소류신(L-Isoleucine), 류신(L-Leucine), 라이신(L-Lysine), 메티오닌(L-Methionine), 페닐알라닌(L-Phenylalanine), 세린(L-Serine), 트레오닌(L-Threonine), 트립토판(L-Tryptophan), 프롤린(L-Proline), 발린(L-Valine), 칼슘판토테네이트(D-Calcium pantothenate), 폴릭애씨드(Folic Acid), 나이아신아마이드(Niacinamide), 피리독신에이치씨엘(Pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(Riboflavin), 티아민에이치씨엘(Thiamine hydrochloride), 사이아노코발아민(Vitamin B12), 아스코빅애씨드(Ascorbic Acid), 바이오틴(Biotin), 이노시톨(i-Inositol), 칼슘클로라이드(Calcium Chloride(CaCl2)), 마그네슘설페이트(Magnesium Sulfate(MgSO4)), 포타슘클로라이드(Potassium Chloride(KCl)), 소듐바이카보네이트(Sodium Bicarbonate(NaHCO3)), 소듐클로라이드(Sodium Chloride(NaCl)), 소듐포스페이트(Sodium Phosphate monobasic(NaH2PO4-H2O)), 글루코오스(D-Glucose(Dextrose)), 소듐파이루베이트(Sodium Pyruvate), 아데노신(Adenosine) 및 구아노신(Guanosine) 중 하나 이상을 포함하는 피부 세포 활성화용 조성물.

청구항 22

황산철(Ferrous sulfate);및

리포산(Lipoic acid) 또는 그의 염;을

포함하는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 피부는 진피(Derma) 또는 표피(Epiderma)인 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서,

상기 세포는 완전히 분화된 세포(Fully differentiated cell). 전구세포(Progenitor cell) 또는 줄기세포(Stem cell)인 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 동물 유래 혈청을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 26

제22항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)이 1:1 내지 1:10 몰농도 비율로 포함 된 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 27

제22항에 있어서,

상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)이 1:4 내지 1:8 몰농도 비율로 포함 된 피부 세포

활성화용 화장료 조성물.

청구항 28

제22항에 있어서,

상기 화장료는 유연화장수, 영양화장수, 로션, 스킨, 바디로션, 영양크림, 마사지 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 아이크림, 에센스, 클렌징폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 팩, 젤, 패치, 립스틱, 메이크업베이스, 파우더, 파운데이션, 바디클렌저, 치약, 구강 청정제, 샴푸, 린스, 헤어토닉, 젤, 무스, 헤어 에센스 등의 정발제, 양모제 및 염모제로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 29

제22항에 있어서,

상기 조성물은 하기의 효과 중 하나 이상을 나타내는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물:

i) 항노화 효과;

ii) 재생 효과;

iii) 주름 개선 효과;

iv) 미백 효과; 및

v) 피부 탄력 증가 효과.

청구항 30

제22항에 있어서,

글라이신(Glycine), 알지닌(L-Arginine), 글루타민(L-Glutamine), 글루타믹애씨드(L-Glutamic Acid), 아스파라진(L-Asparagine-H2O), 알라닌(L-Alanine), 아스파틱애씨드(L-Aspartic acid), 시스테인에이치씨엘(L-Cysteine hydrochloride-H2O), 히스티딘(L-Histidine), 이소류신(L-Isoleucine), 류신(L-Leucine), 라이신(L-Lysine), 메티오닌(L-Methionine), 페닐알라닌(L-Phenylalanine), 세린(L-Serine), 트레오닌(L-Threonine), 트립토판(L-Tryptophan), 프롤린(L-Proline), 발린(L-Valine), 칼슘판토테네이트(D-Calcium pantothenate), 폴릭애씨드(Folic Acid), 나이아신아마이드(Niacinamide), 피리독신에이치씨엘(Pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(Riboflavin), 티아민에이치씨엘(Thiamine hydrochloride), 사이아노코발아민(Vitamin B12), 아스코빅애씨드(Ascorbic Acid), 바이오틴(Biotin), 이노시톨(i-Inositol), 칼슘클로라이드(Calcium Chloride(CaCl2)), 마그네슘설페이트(Magnesium Sulfate(MgSO4)), 포타슘클로라이드(Potassium Chloride(KCl)), 소듐바이카보네이트(Sodium Bicarbonate(NaHCO3)), 소듐클로라이드(Sodium Chloride(NaCl)), 소듐포스페이트(Sodium Phosphate monobasic(NaH2PO4-H2O)), 글루코오스(D-Glucose(Dextrose)), 소듐파이루베이트(Sodium Pyruvate), 아데노신(Adenosine) 및 구아노신(Guanosine) 중 하나 이상을 더 포함하는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

청구항 31

제22항에 있어서,

동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연, 락토스, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트, 폴리아마이드 파우더, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸클리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 소르비탄의 지방산 에스테르, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르, 알루미늄 메타히드록시드, 아가, 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이

트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 라놀린 유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르, 스테아린산, 세토스테아릴 알코올, 모노스테아린산 글리세린, 스쿠알란, 농글리세린, 히아루로닉엑시드추출물 및 세피겔 350 중 하나 이상을 더 포함하는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 피부 세포 활성화용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 피부 줄기세포 활성화용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 줄기세포 화장품에 대한 관심이 증가하고 있으며, 일반적인 줄기세포 화장품은 줄기세포 배양 시 분비되는 성분들을 포함하는 줄기세포 배양액을 구성요소로 하는 화장품을 의미한다.

[0004] 이러한 줄기세포 배양액 뿐만 아니라 줄기세포 자체의 활성을 증가시킬 수 있는 성분을 포함하는 화장품이 개발되고 있으며, 이 경우 저비용 원료, 간단한 공정을 통해 화장품을 제조할 수 있는 장점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 출원에 의해 개시되는 내용에 의해 달성하고자 하는 일 예는, 피부 세포 활성화용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0007] 본 출원에 의해 개시되는 내용에 의해 달성하고자 하는 다른 예는, 피부 세포 활성화용 화장료 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0008]

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 과제를 달성하기 위하여, 본 출원에 의해 개시되는 기술의 일 양태에 따르면, 황산철(Ferrous sulfate); 및 리포산(Lipoic acid) 또는 그의 염;을 포함하는 피부 세포 활성화용 조성물이 제공된다.

[0010] 상기 황산철(Ferrous sulfate)은 황산 제1철(황산철(II); $FeSO_4$)일 수 있고, 예를 들어, 4수염($FeSO_4 \cdot 4H_2O$), 5수염($FeSO_4 \cdot 5H_2O$), 6수염($FeSO_4 \cdot 6H_2O$) 및 7수염($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0011] 또한, 상기 리포산(Lipoic acid)은 알파리포산(α-lipoic acid) 또는 베타리포산(β-lipoic acid)일 수 있고, 상기 알파리포산(α-lipoic acid)은 (R)-(+)-알파리포산((R)-(+)-α-lipoic acid), (S)-(-)-알파리포산((S)-(-)-α-lipoic acid) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0012] 상기 피부는 진피(Derma) 또는 표피(Epiderma)일 수 있으며, 상기 조성물에 의해 활성화되는 세포는 완전히 분화된 세포(Fully differentiated cell), 전구세포(Progenitor cell) 또는 줄기세포(Stem cell)일 수 있다.

[0013] 또한, 상기 피부 세포 활성화용 조성물에는 주요 성분으로 작용하는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 또는 그의 염 외에도 아미노산, 당류, 비타민, 무기염류, 지질, 사이토카인(Cytokine), 성장인자(Growth factor), 세포 외 기질 단백질, 배지, 항산화 물질, 멜라닌 색소 합성 억제 물질, 멜라닌 색소를 포함하는 세포에 작용하는 독성물질 및 각질 박리 물질 중 하나 이상을 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[0014] 상술한, 피부 세포 활성화용 조성물은 i) 세포 증식효과 기능 및/또는 세포 노화 조절자 발현 억제 기능을 할 수 있다. 상기 노화 조절자는 CDK 억제제 (CDK(Cyclic-dependent Kinase) inhibitor)이며, 구체적으로 P21,

P27, P57, P16, P15, P18, P19, P53 및 p-P53 중 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 다른 양태에 따르면, 황산철(Ferrous sulfate); 및 리포산(Lipoic acid) 또는 그의 염; 중 하나 이상을 포함하는 피부 세포 활성화용 화장료 조성물이 제공된다.

[0016] 상기 화장료 조성물은 글라이신(Glycine), 알지닌(L-Arginine), 글루타민(L-Glutamine), 글루타믹애씨드(L-Glutamic Acid), 아스파라진(L-Asparagine-H2O), 알라닌(L-Alanine), 아스파틱애씨드(L-Aspartic acid), 시스테인에이치씨엘(L-Cysteine hydrochloride-H2O), 히스티딘(L-Histidine), 이소류신(L-Isoleucine), 류신(L-Leucine), 라이신(L-Lysine), 메티오닌(L-Methionine), 페닐알라닌(L-Phenylalanine), 세린(L-Serine), 트레오닌(L-Threonine), 트립토판(L-Tryptophan), 프롤린(L-Proline), 발린(L-Valine), 칼슘판토테네이트(D-Calcium pantothenate), 폴릭애씨드(Folic Acid), 나이아신아마이드(Niacinamide), 피리독신에이치씨엘(Pyridoxine hydrochloride), 리보플라빈(Riboflavin), 티아민에이치씨엘(Thiamine hydrochloride), 사이아노코발아민(Vitamin B12), 아스코빅애씨드(Ascorbic Acid), 바이오틴(Biotin), 이노시톨(i-Inositol), 칼슘클로라이드(Calcium Chloride(CaCl2)), 마그네슘설페이트(Magnesium Sulfate(MgSO4)), 포타슘클로라이드(Potassium Chloride(KCl)), 소듐바이카보네이트(Sodium Bicarbonate(NaHCO3)), 소듐클로라이드(Sodium Chloride(NaCl)), 소듐포스페이트(Sodium Phosphate monobasic(NaH2PO4-H2O)), 글루코오스(D-Glucose(Dextrose)), 소듐파이루베이트(Sodium Pyruvate), 아데노신(Adenosine) 및 구아노신(Guanosine) 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0017] 상기 화장료는 유연화장수, 영양화장수, 로션, 스킨, 바디로션, 영양크림, 마사지 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 아이크림, 에센스, 클렌징폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 팩, 젤, 패치, 립스틱, 메이크업베이스, 파우더, 파운데이션, 바디클렌저, 치약, 구강 청정제, 샴푸, 린스, 헤어토닉, 젤, 무스, 헤어 에센스 등의 정발제, 양모제 및 염모제로 이루어진 군에서 선택되는 제형일 수 있다.

[0018] 상기 화장료 조성물에 의해 i) 항노화 효과, ii) 재생 효과, iii) 주름 개선 효과, iv) 미백 효과 및/또는 v) 피부 탄력 증가 효과가 나타날 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 명세서에 의해 개시되는 조성물에 의해 세포 활성화 효과가 나타날 수 있으며, 궁극적으로 피부 상태 개선효과도 나타난다.

[0021] 세포 활성화 효과로 세포 증식, 분화 또는 세포 노화 억제 효과일 수 있다. 또한, 피부상태 개선 효과로 주름 개선 효과, 항노화 효과, 피부 탄력 효과, 미백효과가 나타날 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 일 실시예에 따른 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)이 변형배지에 포함된 MixⅡ와 다른 성분들이 변형배지에 포함된 Mix Ⅰ 및 MixⅢ에 의한 인간 섬유아세포 (Human Primary Fibroblast) 증식 효과를 나타낸다.

도 2의 (a)는 알파리포산(α-Lipoic acid)이 포함된 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)의 증식 정도를 나타낸다.

도 2의 (b)는 황산철(Ferrous sulfate)이 포함된 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)의 증식 정도를 나타낸다.

도 3은 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)이 포함된 조성물(실험예(a) 내지 실험예(i))에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식 효과를 나타낸다.

도 4는 홀로클론(Holoclone)의 진피 줄기세포 마커(CD29(+), CD34(-)) 확인 결과 및 홀로클론(Holoclone) 증식 효과를 나타낸다.

도 5는 홀로클론(holoclone)의 진피 줄기세포 마커(CD44(+), CD90(+), CD105(+)) 확인 결과를 나타낸다.

도 6은 황산철(Ferrous sulfate)을 포함하는 조성물에 의한 홀로클론(holoclone) 증식 정도를 나타낸다.

도 7은 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 홀로클론(Holoclone) 증식 정도를 나타낸다.

도 8은 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)이 포함된 조성물(실험예(1) 내지 실험예(9))에 의한 홀로클론(Holoclone) 증식 효과를 나타낸다.

도 9는 실험예(8)에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)와 홀로클론(Holoclone)의 증식 효과를 비교하는 그래프이다.

도 10은 실험예(1) 내지 실험예(9)에 의한 골수 유래-중간엽 줄기세포의 증식 정도를 나타낸다.

도 11은 실험예(1) 내지 실험예(9)에 의한 지방 유래-중간엽 줄기세포의 증식 정도를 나타낸다.

도 12는 조성물 MixⅠ, MixⅡ 및 MixⅢ에 의한 상처 치유(Wound Healing) 효과를 나타낸다.

도 13은 실험예(8)에 의한 노화 마커(p-P53, P21) 발현 억제 효과를 나타낸다.

도 14는 DMEM 기본배지에 L-아스파틱애씨드(L-Aspartic acid), L-알라닌(L-Alanine) 또는 프롤린(Proline)을 포함한 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식 정도를 나타낸다.

도 15는 DMEM 기본배지에 판토텐산 칼슘염(Pantothenic acid Ca-salt), 피리독신에이치씨엘(Pyridoxine hydrochloride) 또는 L-아스코르브산(L-Ascorbic acid)을 포함한 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식 정도를 나타낸다.

도 16은 DMEM 기본배지에 L-아스파라긴 모노하이드레이트(L-asparagine monohydrate), L-글루타믹애씨드(L-Glutamic acid) 또는 D-비오틴(D-biotin)을 포함한 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식 정도를 나타낸다.

도 17은 DMEM 기본배지에 징크썰페이트 헵타하이드레이트(Zinc Sulfate Heptahydrate) 또는 리보플라빈(Riboflavin)을 포함한 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식 정도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] **용어의 정의**

[0026] 본 명세서에서 사용되는 대표적인 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0027] 용어 "피부"는 외부 자극으로부터 체내의 기관 및 근육을 보호하는 조직으로 구성된 기관으로, 다양한 외부적 요인에 의해 손상될 수 있으며, 상기 피부는 표피, 진피 및 피하지방층으로 이루어져 있다.상기 표피(Epidermis)는 각질층, 과립층, 유극층, 기저층으로 구성된다.

[0028] 상기 표피는 각질형성세포(Keratinocyte), 멜라닌생성세포(Melanocyte), 랑게르한스 세포(Langerhans cell), 메르켈 세포(Merkels cell)를 포함하며, 각질형성세포(Keratinocyte)가 표피세포의 대부분(약 95%)을 차지한다.

[0029] 상기 진피(Dermis)는 표피와 피하지방층 사이에 존재하는 피부의 층으로, 콜라겐, 엘라스틴 등 세포 외 기질 단백질과 섬유아세포(Fibroblast)를 포함한다.

[0030] 상기 피하지방층(Hypodermis)은 피부의 가장 두꺼운 층으로, 지방 조직 및 결체조직으로 이루어져 있다. 피하지방층은 지방세포를 포함한다.

[0031] 상기 피하지방층(Hypodermis)은 피부의 가장 두꺼운 층으로, 지방 조직 및 결체조직으로 이루어져 있다. 피하지방층은 지방세포를 포함한다.

[0032] 용어 "섬유아세포(Fibroblast)"는 세포 외 기질과 콜라겐을 합성하는 세포의 일종으로, 결합 조직의 구조적 완전성을 유지하도록 세포 외 기질의 전구체를 분비하는 기능을 한다.

[0033] 용어 "일차 세포(Primary cell)"는 살아있는 조직으로부터 분리 배양된 세포를 의미한다.

[0034] 용어 "인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)"는 인체 조직으로부터 분리 배양된 섬유아세포를 의미한다.

[0035] 용어 "줄기세포"는 복제를 통한 자기재생산 및 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 미분화 세포를 의미한다. 예를 들어, 배아 줄기세포 또는 성체 줄기세포가 있다.

[0036] 용어 "성체 줄기세포"는 특정 조직이나 장기의 분화된 세포 사이에 존재하는 미분화된 세포로, 손상된 조직을 대체하고 복구하는 역할을 할 수 있다. 성체 줄기세포는 각 표적기관으로만 분화할 수 있다.

[0037] 용어 "피부 줄기세포(Skin stem cell)"는 성체 줄기세포의 한 종류로 피부 세포에 극히 소량으로 존재한다. 예를 들어, 피부 줄기세포는 표피 줄기세포, 모낭 줄기세포 또는 진피 줄기세포가 있다.

[0038] 용어 "홀로클론(Holoclone)"은 콜로니(Colony)를 형성하는 줄기세포로 당업자에게 잘 알려져 있다. (Nature Medicine volume 12, pages 1397-1402 (2006))

[0039] 본 명세서에서는 상기 용어 "홀로클론(Holoclone)"과 상기 용어 "줄기세포"를 혼용해서 작성할 수 있다.

[0040] 용어 "피부 세포"는 피부로부터 유래하는 세포를 의미한다. 예를 들어, 상기 피부 세포는 섬유아세포(Fibroblast), 피부 줄기세포(Skin stem cell) 및 전구세포(Progenitor cell)를 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 용어 "배지"는 세포를 배양(Culture)하기 위한 양분이 들어 있는 배지로, 상기 배지는 기본배지 또는 변형배지일 수 있다. 예를 들어, 상기 배지는 고체형 배지 또는 액체형 배지일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 용어 "배양"은 상기 세포를 증식(Proliferation) 또는 유지 시키는 것을 의미하며, 상기 배양은 접착 배양(Adherent culture) 및 부유 배양(Suspension culture) 모두 포함할 수 있다.

[0043] 용어"증식(Proliferation)"이란, 세포가 분열되어 세포 수가 증가하는 것을 의미할 수 있으며, 상기 세포의 증식은 단층으로의 증식 또는 다층으로의 증식을 모두 포함한다.

[0044] 용어 "기본배지"는 세포 배양을 위한 시판되는 배지로, 세포 배양에 통상적으로 사용되는 공지의 배지일 수 있다.

[0045] 예를 들어, 상기 기본 배지는 DMEM 배지, MEM, BME, RPMI 1640, F-10, F-12 또는 α-MEM 배지일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 용어 "변형배지"는 상기 기본배지의 구성 성분 중 일부를 변형한 배지를 의미한다.

[0047] 예를 들어, 상기 변형배지는 기본배지의 구성 성분 중 일부가 제거된 경우 일 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 변형배지는 기본배지의 구성 성분에 상기 기본배지의 구성 성분 외의 다른 성분이 추가된 경우 일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 상기 변형배지는 기본 배지의 구성성분 중 일부 성분이 제거되고 상기 기본배지의 구성 성분 외의 다른 성분이 추가된 경우 일 수 있다.

[0048] 용어 “약”이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0049] 이러한 용어들에 더하여, 필요한 경우 기타 용어들이 명세서 내의 다른 곳에서 정의된다. 본원에서 달리 명확하게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 업계 용어들은 업계에서 인식하는 의미를 가질 것이다.

[0050] 이하, 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 상세히 설명한다.

[0052] **세포 활성화용 조성물의 주요성분**

[0053] 본 명세서에 의해서 개시되는 일 내용은 세포 활성화용 조성물을 포함한다.

[0054] 상기 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)중 하나 이상을 필수 성분으로 포함할 수 있다.

[0055] 상기 황산철(Ferrous sulfate)은 녹반(Green vitriol, Iron vitriol), 코퍼러스(Copperas), 멜란테라이트(Melanterite), 조몰노카이트(Szomolnokite), 아이론 설페이트(Iron sulfate, Iron sulphate), 페러스설페이트(Ferrosulfate), FeSO4, 그린 솔트(Green salts)로 지칭될 수 있다.

[0056] 상기 황산철(Ferrous sulfate)은 황산 제 1철(황산철(II);$FeSO_4$), 황산 제1철제2철 (황산철(II)철(III); $FeSO_4 \cdot Fe_2(SO_4)_3$) 또는 황산 제 2철(황산철(III); $Fe_2(SO_4)_3$)일 수 있다.

[0057] 일 구현예로, 황산 제 1철의 경우, 무수염($FeSO_4$), 4수염($FeSO_4 \cdot 4H_2O$), 5수염($FeSO_4 \cdot 5H_2O$), 6수염($FeSO_4 \cdot 6H_2O$)

또는 7수염($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)일 수 있다.

[0058] 다른 구현예로, 황산 제 2철의 경우, 무수염($Fe_2(SO_4)_3$), 3수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 3H_2O$), 6수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$), 7수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$), 7.5수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7.5H_2O$), 9수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$), 10수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 10H_2O$) 또는 12수염($Fe_2(SO_4)_3 \cdot 12H_2O$)일 수 있다.

[0059] 대표적인 예로, 황산철(Ferrous sulfate)은 7수염($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)일 수 있다.

[0060] 통상의 기술자는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 함량을 임의적으로 조절해서 조성물 내에 포함 시킬 수 있으며, 본 명세서에서는 상기 조성물 내 함량을 몰농도(mol/L; M)로 표현할 수 있다.

[0061] 통상의 기술자는 상기 황산철(Ferrous sulfate)의 함량을 임의적으로 조절해서 조성물 내에 포함 시킬 수 있다.

[0062] 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate)은 조성물 내에서 약 0.5μM 내지 1mM 함량으로 포함될 수 있다.

[0063] 일 구현예로, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 0.5μM 내지 100μM 포함될 수 있다.

[0064] 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 0.5μM 내지 1μM 포함될 수 있다. 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 1μM 내지 50μM 포함될 수 있다. 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 50μM 내지 100μM 포함될 수 있다.

[0065] 다른 구현예로, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 100μM 내지 1mM 포함될 수 있다.

[0066] 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 100μM 내지 500μM 포함될 수 있다. 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate)은 약 500μM 내지 1mM 포함될 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 주요 성분으로 포함할 수 있는 황산철(Ferrous sulfate)은 일반적으로 산소를 공급하거나 철분을 보충하는 기능을 하는 물질로 알려져 있다.

[0068] 리포산(Lipoic acid)은 8개의 탄소와 2개의 황을 갖는 지방산으로, 인체 내에서 소량 생산되는 물질이며 노화에 의해 체내 생산량이 감소된다.

[0069] 상기 리포산(Lipoic acid)은 알파리포산(α-Lipoic acid) 또는 베타리포산(β-Lipoic acid)일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 상기 알파리포산(α-Lipoic acid)은 5-(다이싸이오레-3-닐)펜탄산(5-(dithiolan-3-yl)pentanoic acid), 티옥틱애씨드(Thioctic acid), DL-알파리포산(DL-α-Lipoic acid), 6,8-티옥틱애씨드(6,8-Thioctic acid), 리포싸이온(Lipothion), 리포산(Liposan), 티옥트산(Thioctsan), $C_8H_{14}O_2S_2$ 또는 에스파-리폰(Espa-lipon)로 지칭될 수 있다.

[0071] 일 구현예로, 알파리포산(α-Lipoic acid)은 순수 거울상 이성질체(Pure enantiomers) 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, (R)-(+)-알파리포산((R)-(+)-α-Lipoic acid), (S)-(-)-알파리포산((S)-(-)-α-Lipoic acid) 또는 이들의 혼합물로 존재할 수 있다.

[0072] 다른 구현예로, 알파리포산(α-Lipoic acid)은 그 유도체 또는 염일 수 있다.

[0073] 상기 베타리포산(β-Lipoic acid)은 5-[(1R,3R)-1-케토다이싸이오레-3-닐]발레르산(5-[(1R,3R)-1-ketodithiolan-3-yl]valeric acid), 5-[(1R,3R)-1-옥소-1,2-다이싸이오레-3-닐]펜탄산 (5-[(1R,3R)-1-oxo-1,2-dithiolan-3-yl]pentanoic acid) 또는 $C_8H_{14}O_3S_2$로 지칭될 수 있다.

[0074] 일 구현예로, 베타리포산(β-Lipoic acid)은 순수 거울상 이성질체(pure enantiomers) 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 베타리포산(β-Lipoic acid)은 (R)-(+)-베타리포산((R)-(+)-β-Lipoic acid), (S)-(-)-베타리포산((S)-(-)-β-Lipoic acid) 또는 이들의 혼합물로 존재할 수 있다.

[0075] 통상의 기술자는 상기 리포산(Lipoic acid)의 농도를 임의적으로 조절해서 조성물 내에 포함 시킬 수 있다.

[0076] 예를 들어, 상기 리포산(Lipoic acid)은 조성물 내에서 약 0.5μM 내지 1mM 함량으로 포함될 수 있다.

[0077] 일 구현예로, 리포산(Lipoic acid)은 약 0.5μM 내지 100μM 포함될 수 있다.

[0078] 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은 약 0.5μM 내지 50μM 포함될 수 있다. 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은

약 50㎛ 내지 100㎛ 포함될 수 있다. 구체예로, 리포산(Lipoic acid)은 약 0.5㎛ 포함될 수 있다.

[0079] 다른 구현예로, 리포산(Lipoic acid)은 약 100㎛ 내지 300㎛ 포함될 수 있다.

[0080] 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은 약 100㎛ 내지 250㎛ 포함될 수 있다. 구체예로, 리포산(Lipoic acid)은 약 200㎛ 포함될 수 있다. 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은 약 250㎛ 내지 300㎛ 포함될 수 있다.

[0081] 또 다른 구현예로, 리포산(Lipoic acid)은 약 300㎛ 내지 500㎛ 포함될 수 있다.

[0082] 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은 약 300㎛ 내지 450㎛ 포함될 수 있다.구체예로 리포산(Lipoic acid)은 약 400㎛ 포함될 수 있다. 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은 약 450㎛ 내지 500㎛ 포함될 수 있다.

[0083] 또 다른 구현예로, 리포산(Lipoic acid)은 약 500㎛ 내지 1mM 포함될 수 있다.

[0084] 본 명세서에서 주요 성분으로 포함할 수 있는 리포산(Lipoic acid)은 일반적으로 체내 대사조절을 하는 조효소 및 항산화제 기능을 하는 물질로 알려져 있다.

[0085] 예를 들어, 리포산(Lipoic acid)은 지방 분해, 미토콘드리아 활성화, 체내 항산화 물질 합성 촉진 또는 체내 항산화 물질 재활성화 역할을 한다.

[0086] 본 명세에 의해 제공되는 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 조합을 포함할 수 있다.

[0087] 상기 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5㎛ 내지 1mM 및 리포산(Lipoic acid) 약 0.5 ㎛ 내지 1mM 을 포함할 수 있다.

[0088] 일 구현 예로, 상기 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5㎛ 내지 100㎛ 및 리포산(Lipoic acid) 약 0.5 ㎛를 포함할 수 있다.

[0089] 다른 구현 예로, 상기 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5㎛ 내지 100㎛ 및 리포산(Lipoic acid) 약 200㎛ 을 포함할 수 있다.

[0090] 또 다른 구현 예로, 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5㎛ 내지 100㎛ 및 리포산(Lipoic acid) 약 400 ㎛을 포함할 수 있다.

[0092] **조성물 주요성분의 기능**

[0093] 상술한 일반적인 기능뿐만 아니라, 본 명세서에서 개시하고 있는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 중 하나 이상을 포함하는 조성물은 세포의 활성을 증가시키기 위한 주요한 역할을 하는 물질일 수 있다.

[0094] 구체적으로, 상기 리포산(Lipoic acid)이 세포의 활성을 증가시키는데 주요한 역할을 할 수 있다. 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)의 조합을 통해 세포의 활성 증가 효과가 더 커질 수 있다.

[0095] 용어 "세포 활성"은

[0096] i) 세포의 증식,

[0097] ii) 세포 재생,

[0098] iii) 존재하는 세포의 노화 방지 또는

[0099] iv) 세포 미백 효과를 포함할 수 있다.

[0100] 이 외에도, 당 업계에서 사용되는 일반적인 용어 "활성"의 의미를 포함할 수 있다.

[0101] 일 구현예로, 상기 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물은 세포의 활성을 증가시키기 위한 주요한 역할을 하는 물질일 수 있다.

[0102] 또 다른 구현예로, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 조합을 포함하는 조성물은 세포의 활성을 증가시키기 위한 주요한 역할을 하는 물질일 수 있다.

[0103] 상기 활성 증가의 대상이 되는 세포는 피부 세포일 수 있으며, 상기 피부 세포는 표피 및 진피에 존재하는 세포를 포함할 수 있다.

[0104] 상기 피부 세포는 각질형성세포(Keratinocyte), 멜라닌생성세포(Melanocyte), 랑게르한스 세포(Langerhans

cell) 및 메르켈 세포(Merkels cell) 중 하나 이상을 포함할 수 있다..

[0105] 상기 피부 세포는 피부의 진피에 존재하는 섬유아세포(Fibroblast)를 포함할 수 있다.

[0106] 상기 피부 세포는 완전히 분화된 세포(Fully differentiated cell), 전구세포(Progenitor cell) 및 줄기세포(Stem cell) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0107] 용어 "전구세포(Progenitor cell)"는 줄기세포와 완전히 분화된 세포의 중간단계의 세포로, 특정 세포로 분화될 수 있고 줄기세포와 달리 제한된 횟수로만 분열할 수 있다.

[0108] 피부 상태 개선을 위한 방법 중 하나로 상기 세포의 활성 증가가 필요하며, 이는 피부 노화나 손상에 의해 세포의 활성이 감소하기 때문이다.

[0109] 예를 들어, 피부 노화나 손상이 있는 경우, 피부 세포들 중 완전히 분화된 세포 뿐만 아니라 줄기세포도 활성이 감소하게 되며, 활성이 감소한 줄기세포는 활성이 감소되지 않은 줄기세포에 비해 자세포 생산 능력이 약 1/3 정도로 떨어진다. 자세포 수의 감소에 따라 피부의 재생능이 떨어지게 되며, 그 대표적인 예가 주름이다.

[0110] 따라서, 피부 재생, 항노화 또는 피부 탄력 유지를 위해 세포 활성 증가가 필요하다.

[0111] 상기 활성 증가의 대상이 되는 세포는 완전히 분화된 세포(Fully differentiated cell)에 한정되지 않을 수 있다.

[0112] 예를 들어, 활성 증가의 대상이 되는 세포는 근육세포, 신경세포, 생식세포, 면역세포 또는 골세포일 수 있다.

[0113] 또한, 상기 활성 증가의 대상이 되는 세포의 분화 정도는 한정되지 않는다.

[0114] 예를 들어, 분화된 세포(Fully differentiated cell), 전구세포(Progenitor cell) 또는 줄기세포(Stem cell) 모두 활성 증가의 대상이 될 수 있다.

[0115] 구체적으로, 배아줄기세포(Embryonic stem cell), 성체줄기세포(Adult stem cell) 또는 역분화 줄기세포(induced Pluripotent stem cell)는 활성 증가의 대상이 될 수 있다.

[0117] **세포 활성화용 조성물의 임의적 성분**

[0118] 본 출원에 의해 개시되는 피부 세포 활성화용 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)외의 임의적 구성 성분을 포함할 수 있다.

[0119] 상기 임의적 구성성분은 영양소, 리보뉴클레오사이드(Ribonucleosides), 디옥시리보뉴클레오사이드(Deoxyribonucleosides), 단백질, 동물유래 혈청, 담체 성분, 이외 피부 개선에 사용될 수 있는 성분 및 기타 물질 중 하나 이상을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0120] 또한, 상기 임의적 구성성분은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합될 수 있다.

[0121] 일 구현예로, 상기 영양소는 아미노산, 당류, 비타민, 무기염류 및 지질로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0122] 예를 들어, 아미노산은 글라이신(Glycine), 알지닌(Alginine), 알지닌에이치씨엘(Alginine hydrochloride) 글루타민(Glutamine), 히스티딘(Histidine), 아이소류신(Isoleucine), 세린(Serine), 류신(Leucine), 라이신(Lysine), 메티오닌(Methionine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 트레오닌(Threonine), 트립토판(Tryptophan), 발린(Valine), 타이로신(Tyrosine), 시스테인(Cysteine), 시스테인에이치씨엘(L-Cysteine hydrochloride-H2O), 프롤린(Proline), 아스파라진(L-Asparagine-H2O), 아스파라긴(Asparagine), 글루타믹애씨드(Glutamic acid), 아스파틱애씨드(Aspartic Acid), 히스티딘에이치씨엘(Histidine hydrochloride-H2O), 및 알라닌(Alanine)으로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0123] 예를 들어, 당류는 글루코오스(Glucose), 갈락토오스(Galactose), 리보오스(Ribose), 프럭토오스(Fructose), 수크로오스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 및 말토오스(Maltose)로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0124] 예를 들어, 비타민은 비타민A, 비타민B1, 비타민B2, 비타민B3, 비타민B5, 비타민B6, 비타민B7, 비타민B9, 비타민B12, 비타민C, 비타민D, 비타민E 및 비타민K로 이루어진 그룹 또는 이들의 전구체로 이루어진 그룹에서 하나

이상 선택될 수 있다.

[0125] 구체적으로, 비타민은 레티놀, 레티날, 레티노이드, 카로테노이드, 티아민, 티아민에이치씨엘(Thiamine hydrochloride), 리보플라빈(Riboflavin), 니아신, 나이아신아마이드(Niacinamide), 판토텐산, 피리독신, 피리독신에이치씨엘(Pyridoxine hydrochloride), 피리독사민, 피리독살, 바이오틴(Biotin), 엽산, 폴린산, 시아노코발라민(Vitamin B12), 히드록시코발라민, 메틸코발라민, 아스코빅애씨드(Ascorbic Acid), 에르고칼시페롤, 콜레칼시페롤, 토코페롤, 토코트리에놀, 필로퀴논, 메나퀴논, 칼슘판토테네이트(D-Calcium pantothenate), 폴릭애씨드(Folic Acid), 리보플라빈 및 이노시톨(i-Inositol)로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0126] 예를 들어, 무기염류는 코발트(Co), 구리(Cu), 플루오린(F), 철(Fe), 칼륨(K), 망간(Mn), 몰리브데넘(Mo), 니켈(Ni), 셀레늄(Se), 규소(Si), 비스무트(Bi), 바나듐(V) 및 아연(Zn)으로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다. 구체적으로, 황산구리($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 염화나트륨(NaCl), 염화칼슘($CaCl_2 \cdot H_2O$), 염화칼륨(KCl), 황산마그네슘($MgSO_4$), 소듐포스페이트($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), 탄산수소나트륨($NaHCO_3$), 염화마그네슘($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 질산철($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) 및 황산아연($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0127] 예를 들어, 지질은 리놀레익산(Linoleic acid)일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0128] 다른 구현예로, 단백질은 세포 신호체계에 관여하는 단백질 또는 세포 외 기질단백질일 수 있으며, 이들은 세포로부터 분비된 물질일 수 있다.

[0129] 예를 들어, 리보뉴클레오사이드(Ribonucleosides)는 아데노신(Adenosine), 사이티딘(Cytidine), 구아노신(Guanosine), 우리딘(Uridine)일 수 있다.

[0130] 예를 들어, 디옥시리보뉴클레오사이드(Deoxyribonucleosides)는 티미딘(Thymidine)일 수 있다.

[0131] 예를 들어, 세포 신호체계에 관여하는 단백질은 사이토카인(Cytokine) 또는 성장인자(Growth factor)일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0132] 구체적으로, 사이토카인(Cytokine)은 MCP-2, MCP-4, MDC, NAP-2, ICAM-1, MIP-1α, MIP-1β, sTNF-RII, sTNF-RI, TIMP-1, TIMP-2, uPAR, CD14, CXCL-16, MMP-9, PDGF-AA 및 TGFβ2로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0133] 구체적으로, 성장인자(Growth factor)는 유사인슐린 성장 인자(Insulin-like growth factor, IGF), 표피 성장 인자(Epidermalgrowth factor, EGF), 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast growth fac-tor, FGF), 신경 성장 인자(Nerve growth factor, NGF), 형질전환 성장 인자(Trans-forming growth factor, TGF), 혈소판유래성장인자(Platelet-derived growth fac-tor, PDGF), 뼈유래 성장 인자(Bone-derived growth factor, BDF) 및 콜로니 자극 인자(Colony stimulation factor, CSF)로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0134] 예를 들어, 세포 외 기질단백질은 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 및 파이브로넥틴으로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0135] 또 다른 구현예로, 동물유래 혈청은 소 유래 혈청일 수 있고, 이에 한정되지 않는다.

[0136] 예를 들어, 소유래 혈청은 FBS(Fetal Bovine Serum), BCS(Bovine Calf Serum) 및 FCS(Fetal Calf Serum)로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0137] 본 명세서에서 제공되는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)중 하나 이상을 포함하는 조성물은 상기 동물 유래 혈청이 포함되지 않을 수 있다.

[0138] 또 다른 구현예로, 담체 성분은 세포 배양을 위한 배지 조성물, 화장료 담체 및 약학적 담체 중 하나 이상일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0139] 예를 들어, 세포 배양을 위한 배지 조성물은 증류수, PBS(Phosphate-buffered saline), 생리식염수, 기본배지 및 변형배지로 구성된 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0140] 구체적으로, 상기 기본배지는 DMEM low glucose, DMEM high glucose, KGB-SFM, MEM, BME, RPMI 1640, F-10, F-

12, α-MEM, G-MEM, IMDM, MacCoy's 5A, AmnioMax, AmnioMax Ⅱ complete Medium, DMEM-F12 및 Chang's Medium, MesenCult-XF Medium로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0141] 구체적으로, 상기 변형배지는 DMEM의 변형배지, α-MEM의 변형배지 또는 F-10의 변형배지 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0142] 예를 들어, 화장료 담체의 성분으로 사용될 수 있는 조성물은 식약처에서 고시한 화장품 원료로 허용된 성분으로 구성될 수 있다.

[0143] 구체적으로, 화장료의 제형이 페이스트, 겔, 크림인 경우, 화장료 담체 분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 및 산화아연으로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0144] 구체적으로, 화장료의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 화장료 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 및 폴리아마이드 파우더로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 스프레이의 경우 추가적으로 추진체를 포함할 수 있다. 예컨대, 추진체는 클로로플루오로히드로카본, 프로판, 부탄 및 디메틸 에테르로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0145] 구체적으로, 화장료의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우, 화장료 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용될 수 있다. 보다 구체적으로, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸클리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0146] 구체적으로, 화장료의 제형이 현탁액인 경우, 화장료 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜 등의 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 및 트라칸트로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0147] 구체적으로, 화장료의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우, 화장료 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 및 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0148] 예를 들어, 약학적 담체의 성분으로 사용될 수 있는 조성물은 식약처에서 고시한 의약품 원료로 허용된 성분으로 구성될 수 있다.

[0149] 구체적으로 의약품에 포함되는 약학적 담체는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0150] 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0151] 보다 구체적으로, 비경구 투여를 위한 비수성용제 또는 현탁제의 경우, 약학적 담체 성분으로서 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름 및 에틸올레이트와 같은 에스테르로 구성된 그룹에서 하나 이상이 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0152] 보다 구체적으로, 비경구 투여를 위한 좌제의 경우, 약학적 담체 성분으로서 위텝솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지 및 글리세로젤라틴으로 이루어진 그룹에서 하나 이상이 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0153] 보다 구체적으로, 경구 투여를 위한 고형제제의 경우, 약학적 담체 성분으로서 부형제 또는 윤활제를 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 부형제의 경우 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스 및 젤라틴으로 구성된 그룹에서 하나 이상이 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 윤활제의 경우 마그네슘 스티레이트 또는 탈크일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0154] 보다 구체적으로, 경구 투여를 위한 액상 제제의 경우, 약학적 담체 성분으로서 물, 리퀴드 파라핀 또는 부형제가 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 부형제는 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제일 수 있다.

[0155] 또 다른 구현예로, 피부 개선에 사용될 수 있는 성분은 항산화 물질, 멜라닌 색소 합성 억제물질, 멜라닌 색소를 포함하는 세포에 작용하는 독성물질 또는 각질을 박리 시키는 물질일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0156] 구체적으로, 항산화 물질은 카로티노이드류, 플라보노이드류, 이소플라본류, 비타민 또는 미네랄일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 카로티노이드류는 베타카로틴, 라이코펜 또는 루테인일 수 있다. 보다 구체적으로, 플라보노이드류는 안토시아닌, 카테킨, 레스베라트롤 또는 프로안토시아니딘일 수 있다.

[0157] 보다 구체적으로, 이소플라본류는 제니스테인, 다이드제인일 수 있다. 보다 구체적으로 비타민은 토코페롤일 수 있다.

[0158] 구체적으로, 멜라닌 색소 합성 억제물질은 티로시나아제 저해제 또는 활성산소를 제거하는 물질일 수 있다. 보다 구체적으로, 티로시나아제 저해제는 닥나무 추출물, 알부틴, 감초 추출물, 비타민C, 코직산 또는 알파비사보롤(α-Bisabolol)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0159] 보다 구체적으로, 활성산소를 제거하는 물질은 항산화 물질일 수 있다.

[0160] 구체적으로, 멜라닌 색소를 포함하는 세포에 작용하는 독성물질은 하이드로퀴논 또는 그 유도체일 수 있다.

[0161] 구체적으로 각질을 박리시키는 물질은 알파하이드록시산(AHA)일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0162] 또 다른 구현예로, 본 명세서에서 제공되는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 중 하나 이상을 포함하는 조성물에 기타 세포의 에너지원, 항생제, 향료, 방부제 또는 색소를 추가적으로 더 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 기타 세포의 에너지원은 소듐파이루베이트일 수 있다. 예를 들어, 방부제는 페녹시에탄올 또는 1,2-헥산디올일 수 있다.

[0163] 본 명세서에 개시된 조성물에는 전술한 구성요소 외에도 추가적인 성분이 더 포함될 수 있다.

[0165] **세포 활성화용 조성물의 효과**

[0166] 본 명세서에 의해서, 세포 활성화 효과를 일으키는 다양한 조성물이 제공될 수 있다.

[0167] 일 구현예로, 필수 성분으로서 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의해 세포의 활성화 효과가 나타날 수 있다. 구체적으로, 상기 리포산(Lipoic aicd)에 의해 세포 활성화 효과가 나타날 수 있다.

[0168] 또 다른 구현예로, 필수 성분으로서 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 조합을 포함하는 조성물에 의해 세포의 활성화 효과가 나타날 수 있다. 구체적으로, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic aicd)의 조합에 의해 세포 활성화 효과가 나타날 수 있다.

[0169] 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 피부 세포의 활성이 증가될 수 있으며, 상기 피부 세포는 표피 또는 진피의 세포일 수 있다.

[0170] 일 구현예로, 피부의 표피에 존재하는 각질형성세포(Keratinocyte), 멜라닌생성세포(Melanocyte), 랑게르한스 세포(Langerhans cell) 또는 메르켈 세포(Merkels cell)의 활성이 증가될 수 있다.

[0171] 다른 구현예로, 피부의 진피에 존재하는 섬유아세포(Fibroblast)의 활성이 증가될 수 있다.

[0172] 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 피부의 표피에 존재하는 줄기세포 또는 피부의 진피에 존재하는 줄기세포의 활성이 증가될 수 있다.

[0173] 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 분화된 피부 세포(Fully differentiated cell)의 활성이 증가될 수 있다.

[0174] 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 피부줄기세포(Skin Stem cell) 또는 전구세포(Progenitor cell)의 활성이 증가될 수 있다.

[0175] 상기 조성물에 의해 피부세포뿐만 아니라, 근육세포, 신경세포, 생식세포, 면역세포 또는 골세포의 활성이 증가될 수 있으며, 분화 정도는 한정되지 않는다. 예를 들어, 분화된 세포(Fully differentiated cell), 전구세포

(Progenitor cell) 또는 줄기세포(Stem cell) 모두 활성이 증가될 수 있다.

[0176] **(1) 세포 활성화용 조성물의 효과 -세포 증식**

[0177] 상기 조성물에 의해 세포의 증식 효과가 증가할 수 있다.

[0178] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 세포 증식 효과와 비교했을 때, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및/또는 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과는 약 2배 이상 높을 수 있다.

[0179] 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과와 비교했을 때, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 특정 농도 조합으로 포함하는 조성물에 의한 피부 세포 증식 효과는 높을 수 있다.

[0180] 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate)이 약 0.5μM 내지 약 500μM 및 리포산(Lipoic acid)이 약 0.5μM 내지 약 500μM 함량으로 포함된 조성물에 의한 피부 세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과 보다 높을 수 있다.

[0181] 다른 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 특정 비율로 포함하는 조성물에 의한 피부 세포 증식 효과는 높을 수 있다.

[0182] 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:1 내지 1:10 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 세포 증식 효과 보다 높을 수 있다.

[0183] 피부 세포의 종류에 따라, 세포 증식 효과가 높아질 수 있는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 몰농도 비율은 다를 수 있다.

[0184] 일 예로, 섬유아세포(Fibroblast)가 많이 포함된 피부 세포의 경우, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:1 내지 1:2 몰농도 비율로 포함된 경우에 높은 세포 증식 효과가 나타날 수 있다.

[0185] 다른 예로, 피부 줄기세포(Skin stem cell)가 많이 포함된 피부 세포의 경우, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:4 내지 1:8 몰농도 비율로 포함된 경우에 높은 세포 증식 효과가 나타날 수 있다.

[0186] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과는 상기 리포산(Lipoic aicd)없이 상기 황산철(Ferrous sulfate)만 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과에 비해 약 2배 높을 수 있다.

[0187] 뿐만 아니라, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate)없이 상기 리포산(Lipoic acid)만 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과에 비해 높을 수 있다.

[0188] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 황산철(Ferrous sulfate) 및/또는 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포의 특이적인 증식효과가 나타날 수 있다.

[0189] 예를 들어, 골수 유래-중간엽 줄기세포 또는 지방 유래-중간엽 줄기세포의 증식 효과에 비해, 황산철(Ferrous sulfate) 및/또는 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포의 증식 효과는 1.5배 내지 3배 이상 높을 수 있다. 구체적으로, 피부 줄기세포가 아닌 다른 성체 줄기세포에 비해, 황산철(Ferrous sulfate) 및/또는 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포의 증식효과는 2배 내지 3배 이상 높을 수 있다.

[0190] 다른 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포의 증식효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 또는 상기 리포산(Lipoic acid)을 각각 포함하는 조성물에 의한 증식 효과보다 높을 수 있다.

[0191] 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과와 비교했을 때, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 특정 농도 조합으로 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 높을 수 있다.

[0192] 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 내지 약 500 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 0.5μM 내지 약 500μM이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을

포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과 보다 높을 수 있다.

[0193] 보다 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 내지 약 200 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 500μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 2배 내지 4배 높을 수 있다.

[0194] 보다 더 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 내지 약 10 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 500μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 2배 내지 3배 높을 수 있다.

[0195] 일 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 내지 약 10 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 300 μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 2배 내지 3배 높을 수 있다.

[0196] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 200μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 2배 내지 3배 높을 수 있다.

[0197] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 내지 약 10 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 300μM 내지 약 500μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 2배 내지 3배 높을 수 있다.

[0198] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 0.5μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 400μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 2배 내지 3배 높을 수 있다.

[0199] 보다 더 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 10μM 내지 약 60 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 500μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0200] 일 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 10μM 내지 약 60 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 300μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0201] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 50μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 200μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0202] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 10μM 내지 약 60 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 300μM 내지 약 500 μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0203] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 50μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 400μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0204] 보다 더 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 60μM 내지 약 200 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 500μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0205] 일 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 60μM 내지 약 200 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 100μM 내지 약 300 μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0206] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 100μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 200μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0207] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 60μM 내지 약 200 μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 300μM 내지 약

500μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0208] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 약 100μM 및 리포산(Lipoic acid) 약 400μM 이 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0209] 다른 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 특정 비율로 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 높을 수 있다.

[0210] 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:1 내지 1:10 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식효과보다 높을 수 있다.

[0211] 보다 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:2 내지 1:4 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식효과보다 약 3배 내지 약 4배 높을 수 있다.

[0212] 보다 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:4 내지 1:8 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포(Skin stem cell) 증식효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 줄기세포(Skin stem cell) 증식효과보다 약 3배 내지 약 4배 높을 수 있다.

[0213] 일 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:4 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0214] 보다 구체적으로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:8 내지 1:10 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식효과보다 약 3배 내지 약 4배 높을 수 있다.

[0215] 다른 예로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)이 1:8 몰농도 비율로 포함된 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하지 않는 조성물에 의한 증식 효과보다 약 3배 내지 4배 높을 수 있다.

[0216] 또 다른 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 의 조합을 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과는 상기 리포산(Lipoic aicd)없이 상기 황산철(Ferrous sulfate)만 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기 세포 증식 효과에 비해 약 4배 높을 수 있다.

[0217] 뿐만 아니라, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate)없이 상기 리포산(Lipoic acid)만 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 효과에 비해 약 1.5배 내지 약 4배 높을 수 있다.

[0218] 또 다른 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물에 의한 피부줄기세포 증식 효과는 섬유아세포(Primary fibroblast) 증식 효과보다 약 1.5배 내지 약 2배 이상 높을 수 있다.

[0219] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 본 출원의 몇몇 실시예에 의해 제공되는 조성물이 동물 유래 혈청을 포함하지 않는 경우에도, 동물 유래 혈청을 처리한 경우만큼 높은 세포 증식 효과가 나타날 수 있다.

[0220] 구체적으로, 상기 조성물을 섬유아세포(Fibroblast)에 처리할 경우, 동물 유래 혈청을 처리한 경우만큼 증식이 촉진될 수 있다.

[0221] 구체적으로, 상기 조성물을 피부 줄기세포에 처리할 경우, 동물 유래 혈청을 처리한 경우만큼 증식이 촉진될 수 있다.

[0222] 구체적으로, 상기 조성물을 피부 줄기세포에 처리할 경우, 동물 유래 혈청을 처리한 경우보다 더 증식이 촉진될 수 있다.

[0223] 보다 구체적으로, 상기 동물 유래 혈청은 소 유래 혈청일 수 있고, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 소유래 혈청은 FBS(Fetal Bovine Serum), BCS(Bovine Calf Serum) 또는 FCS(Fetal Calf Serum)일 수 있다. 더 구체적으로, 상기 동물 유래 혈청은 10% FBS일 수 있다.

[0225] **(2) 세포 활성화용 조성물의 효과 -세포 재생**

[0226] 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및/또는 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의해 줄기세포(Stem cell) 또는 전구세포(Progenitor cell)의 재생 효과가 나타날 수 있다.

[0227] 일 실시예로, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)를 포함하지 않은 조성물에 의한 세포 재생 효과보다 높을 수 있다.

[0228] 일 구현예로, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 1:2 내지 1:8 몰농도 비율로 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 상기 리포산(Lipoic acid)를 포함하지 않은 조성물에 의한 세포 재생 효과에 비해 2배 내지 3배 이상 높을 수 있다.

[0229] 다른 실시예로, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 또는 상기 리포산(Lipoic acid)을 각각 포함하는 조성물에 의한 재생 효과보다 높을 수 있다.

[0230] 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과는 상기 리포산(Lipoic aicd)없이 상기 황산철(Ferrous sulfate)만 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과에 비해 약 2배 내지 약 4배 높을 수 있다.

[0231] 또 다른 예를 들어, 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate)없이 상기 리포산(Lipoic acid)만 포함하는 조성물에 의한 세포 재생 효과에 비해 약 2배 내지 약 4배 높을 수 있다.

[0233] **(3) 세포 활성화용 조성물의 효과 -세포 노화 방지**

[0234] 상기 조성물에 의해 세포의 노화 방지될 수 있으며, 노화 조절자 발현 억제를 통해 세포 노화 방지 효과를 나타낼 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0235] 용어 "노화 조절자"는 세포 주기를 조절하는 효소의 작용을 억제하는 물질로, 노화 조절자의 발현이 억제될수록 노화가 방지될 수 있다.

[0236] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 노화 조절자의 발현이 억제될 수 있다.

[0237] 예를 들어, 노화 조절자는 CKIs(Cyclin-dependent Kinase Inhibitors) 계열일 수 있다.

[0238] 구체적으로, CKIs는 CIP/KID 계열 또는 INK 계열일 수 있다.

[0239] 보다 구체적으로, CIP/KID 계열은 P21, P27 또는 P57일 수 있다.

[0240] 보다 구체적으로, INK 계열은 P16, P15, P18 또는 P19일 수 있다.

[0241] 예를 들어, 노화 조절자는 P53 또는 p-P53일 수 있다.

[0243] **(4) 세포 활성화용 조성물의 효과 -세포 미백**

[0244] 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및/또는 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의해 세포의 미백 효과가 나타날 수 있다.

[0245] 상기 미백 효과는 세포 내 멜라닌 색소 합성 억제, 세포 내 생성된 멜라닌 색소의 분해, 멜라닌 색소를 포함하는 세포의 파괴 또는 각질 박리에 의한 효과일 수 있다.

[0246] 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물은 티로시나아제 저해제 역할을 하는 물질일 수 있다.

[0247] 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물은 활성산소 또는 유리기를 소거하는 역할을 하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물은 멜라닌 색소를 포함하는 세포를 파괴하는 역할을 하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물은 각질을 박리하는 역할을 하는 물질일 수 있다.

[0248] 구체적으로, 본 명세서에서 제공되는 조성물은 미백 효과를 나타내는 물질로 잘 알려진 알부틴(Arbutin), 나이아신아미드(niacinamide), 코직산(kojic acid) 및/또는 알에스브이(RSV) 보다 높은 미백 효과를 나타낼 수 있다.

[0249] 구체적으로, 본 명세서에서 제공되는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 세포 미백 효과는 상기 황산철(Ferrous sulfate)없이 상기 리포산(Lipoic acid)만 포함하는 조성물에 의한 세포 미백 효과에 비해 높을 수 있다.

[0250] 구체적으로, 본 명세서에서 제공되는 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 세포 미백 효과는 상기 리포산(Lipoic acid) 없이 상기 황산철(Ferrous sulfate)만 포함하는 조성물에 의한 세포 미백 효과에 비해 높을 수 있다.

[0252] **(5) 세포 활성화용 조성물의 효과 -피부 상태 개선**

[0253] 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 피부 상태 개선 효과가 나타날 수 있으며, 표피, 진피 또는 피하지방층의 상태가 개선될 수 있다.

[0254] 피부 상태 개선 효과는 세포 활성화뿐만 아니라 특정 물질의 억제를 통해서도 나타날 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0255] 일 구현예로, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해서 상처 치유(Wound Healing) 효과가 나타날 수 있으며, 이는 피부 세포의 증식 및 세포 재생에 의해 나타나는 효과일 수 있다.

[0256] 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의한 표피 세포의 증식 효과가 나타날 수 있고, 이로 인해 손상된 표피 세포를 재생 및 피부 장벽을 형성시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 표피 세포는 각질형성세포(Keratinocyte), 그의 전구 세포 또는 줄기세포일 수 있다.

[0257] 다른 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의한 진피의 세포 외 기질 구성성분의 생성 또는 진피 세포 증식효과가 나타날 수 있고, 이로 인해 탄력 및 주름 개선 효과가 나타날 수 있다. 구체적으로, 세포 외 기질 구성성분은 콜라겐, 엘라스틴 또는 히알루론산일 수 있다. 구체적으로, 상기 진피세포는 섬유아세포(Fibroblast), 그의 전구 세포 또는 줄기세포일 수 있다.

[0258] 다른 구현예로, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해서 피부 미백효과가 나타날 수 있다.

[0259] 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 세포 내 멜라닌 색소 합성이 억제될 수 있으며, 이로 인해 피부의 미백 효과가 나타날 수 있다.

[0260] 다른 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조성물에 의해 세포 내 생성된 멜라닌 색소가 분해될 수 있으며, 이로 인해 피부의 미백 효과가 나타날 수 있다.

[0262] **세포 활성화용 화장료 조성물**

[0263] 본 명세서에서 제공되는 조성물은 세포 활성화용 화장료 조성물일 수 있다.

[0264] 상기 화장료 조성물은 식약처에서 고시한 화장품 원료로 허용된 성분으로 구성될 수 있다.

[0265] 상기 세포 활성화용 화장료 조성물은 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 중 하나 이상을 포함한다.

[0266] 상기 화장료 조성물은 기초 화장료, 메이크업 화장료, 바디용 화장료 또는 모발용 화장료로 제형화 될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0267] 예를 들어, 기초 화장료는 유연화장수, 영양화장수, 로션, 스킨, 바디로션, 영양크림, 마사지 크림, 모이스처 크림, 선크림, 핸드크림, 아이크림, 에센스, 클렌징폼, 클렌징 크림, 클렌징 워터, 팩, 젤, 오일 또는 패치로 제형화될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0268] 예를 들어, 메이크업 화장료는 립스틱, 메이크업베이스, 파우더 또는 파운데이션으로 제형화될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0269] 예를 들어, 바디용 화장료는 바디클렌저, 치약, 또는 구강 청정제로 제형화될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0270] 예를 들어, 모발용 화장료는 샴푸, 린스, 헤어토닉, 젤, 무스, 헤어 에센스, 헤어팩 등의 정발제, 양모제 또는 염모제로 제형화될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0271] 상기 화장료 조성물은 세포 배양을 위한 배지를 포함할 수 있으나, 화장품 원료로 허용된 성분만 포함 할 수 있다.

[0272] 일 구현예로, 세포 배양을 위한 배지는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid) 중 하나 이상이 포함된 것일 수 있으며, 일반적으로 세포 배양 시 첨가될 수 있는 구성요소가 추가적으로 포함될 수 있다.

[0273] 상기 화장료 조성물은 세포 배양액을 포함할 수 있다.

[0274] 용어 "세포 배양액"은 세포 배양을 통해 세포로부터 분비된 물질이 포함된 배지 또는 세포 배양을 통해 세포로부터 분비된 물질이 포함된 배지로부터 정제하여 얻은 물질을 의미한다.

[0275] 상기 세포 배양을 통해 세포로부터 분비된 물질은 펩타이드(Peptide)일 수 있다.

[0276] 일 구현예로, 펩타이드는 사이토카인(Cytokine)일 수 있다.

[0277] 예를 들어, 사이토카인은 MCP-2, MCP-4, MDC, NAP-2, ICAM-1, MIP-1α, MIP-1β, sTNF-RII, sTNF-RI, TIMP-1, TIMP-2, uPAR, CD14, CXCL-16, MMP-9, PDGF-AA 또는 TGFβ2일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0278] 다른 구현예로, 펩타이드는 성장인자(Growth factor)일 수 있다.

[0279] 예를 들어, 성장인자(Growth factor)는 유사인슐린 성장 인자(Insulin-like growth factor, IGF), 표피 성장 인자(Epidermalgrowth factor, EGF), 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast growth fac-tor, FGF), 신경 성장 인자(Nerve growth factor, NGF), 혈소판유래성장인자(Platelet-derived growth factor, PDGF), 뼈유래 성장 인자(Bone-derived growth factor, BDF) 또는 콜로니 자극 인자(Colony stimulation factor, CSF)일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0280] 상기 화장료 조성물에 의해 세포 활성화 효과가 나타날 수 있으며, 예를 들어, 각질형성세포(Keratinocyte) 또는 섬유아세포(Fibroblast)의 활성화 효과가 나타날 수 있다.

[0281] 구체적으로, 표피 또는 진피 줄기세포의 활성화 효과가 나타날 수 있다.

[0282] 궁극적으로, 상기 화장료 조성물에 의해 항노화 효과, 재생 효과, 주름 개선 효과, 미백 효과, 피부 탄력 효과가 나타날 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0283] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 방법으로 제조될 수 있다.

[0284] 화장료 조성물은 유화(Emulsification), 가용화(Solubilization) 또는 분산(Dispersion) 공정을 통해 제조될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0285] 일 구현예로, 유화(Emulsification)는 고온 유화법(Continental Method), 반전 유화법(Inversion Emulsification Method), D상 유화법(SSA phase Emulsification Method), 전상온도 유화법(PIT Emulsification Method) 또는 액정유화법(LC Emulsification Method)에 의할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0286] 다른 구현예로, 가용화(Solubilization)는 계면활성제와 피가용화 물질을 혼합한 것에 수상 또는 유상을 가하여 희석 하는 것일 수 있다. 다른 예로, 가용화는 계면활성제를 수상 또는 유상 중에 용해해 두고 피가용화 물질을 가하는 것일 수 있다.

[0287] 또 다른 구현예로, 분산(Dispersion)은 분산매를 넣고 교반기를 회전하여 혼합 및 용해 시키는 것 일 수 있다.

[0289] **세포 활성화용 약학적 조성물**

[0290] 본 명세서에서 제공되는 조성물은 세포 활성화용 약학적 조성물일 수 있다.

[0291] 약학적 조성물은 식약처에서 고시한 의약품 원료로 허용된 성분으로 구성될 수 있다.

[0292] 약학적 조성물의 경우 당업자가 사용하는 통상의 방법으로 제작될 수 있다.

[0293] 상기 약학적 조성물은 내형고형제, 주사제, 점안제, 내용액제, 외용액제, 연고제, 첩부제, 고형제 또는 액제일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0294] 예를 들어, 내용고형제는 정제, 질정, 캡슐제, 산제, 과립제, 환제, 트로키제, 시럽제, 흡입제, 구강붕해정, 츄어블정, 발포정, 분산정, 용해정, 발포과립제, 다제, 구강용정제, 설하정, 박칼정, 부착정, 껌제, 구강용해필름, 흡입분말제, 점비분말제, 엑스제 또는 경구용젤리제일 수 있다.

[0295] 예를 들어, 주사제는 주사제, 분말주사제, 수액제, 동결건조주사제, 이식제, 지속성주사제, 복막투석제, 관류제 또는 투석제일 수 있다.

[0296] 예를 들어, 내용액제는 경구용액제, 시럽제, 유제, 현탁제, 엘릭서제, 레모네이드제, 틴크제, 유동엑스제, 주정제, 방향수제, 전제, 침제, 흡입제, 흡입액제, 엑스제, 구강용 스프레이제, 흡입 에어로솔제, 점비액제, 가글제 또는 경구용 젤리제일 수 있다.

[0297] 예를 들어, 외용액제는 로션제, 리니멘트제, 에어로솔제, 외용에어로솔제, 펌프스프레이제, 관장제, 가글제, 혈액투석제, 투석제, 점이제, 점이제 또는 점비액제일 수 있다.

[0298] 예를 들어, 연고제는 크림제, 페이스트제, 리니멘트제, 안연고제, 좌제, 겔제, 구강용반고형제, 직장용반고형제, 질용좌제, 관장제 또는 점이제일 수 있다.

[0299] 예를 들어, 첩부제는 카타플라스마제 또는 경피흡수제일 수 있다.

[0300] 예를 들어, 고형제는 외용산제, 흡입제, 흡입분말제, 외용고형제, 가글제, 혈액투석제, 투석제, 점이제, 점비분말제일 수 있다.

[0302] **세포 활성화용 배지 조성물**

[0303] 본 명세서에서 제공되는 조성물은 세포 활성화용인 세포 배양을 위한 배지 조성물일 수 있다.

[0304] 상기, 세포 배양을 위한 배지는 분화된 세포(Fully differentiated cell) 배양을 위한 배지, 전구세포(Progenitor cell) 배양을 위한 배지 또는 줄기세포(Stem cell) 배양을 위한 배지일 수 있다.

[0305] 예를 들어, 분화된 세포(Fully differentiated cell)는 근육세포, 신경세포, 피부세포, 생식세포, 면역세포 또는 골세포일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0306] 구체적으로, 피부세포는 피부의 표피 세포 또는 피부의 진피 세포일 수 있다.

[0307] 보다 구체적으로, 피부의 표피 세포는 각질형성세포(Keratinocyte) 또는 멜라닌생성세포(Melanocyte)일 수 있다.

[0308] 보다 구체적으로, 피부의 진피 세포는 섬유아세포(Fibroblast)일 수 있다.

[0309] 예를 들어, 줄기 세포(Stem cell)는 배아줄기세포(Embryonic stem cell), 성체줄기세포(Adult stem cell) 또는 역분화 줄기세포(induced Pluripotent stem cell)일 수 있다.

[0310] 구체적으로, 성체 줄기세포는 신경 줄기세포, 조혈모세포, 중간엽 줄기세포, 피부 줄기세포일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0311] 보다 구체적으로, 중간엽 줄기세포는 지방 유래-중간엽줄기세포, 골수 유래-중간엽 줄기세포 또는 제대혈 유래-줄기세포일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0312] 상술한 바와 같이, 본 명세서에서 제공되는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)중 하나 이상을 필수 성분으로 포함하는 조성물에 의해 세포 활성화 효과를 나타날 수 있다.

[0313] 또한, 당업자는 필수 구성성분이 될 수 있는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)외 에도 다른 성분들을 더 포함시킬 수 있다.

[0314] 본 명세서에서 제공되는 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)중 하나 이상을 필수 성분으로 포함하는 조성물은 화장료 조성물, 약학적 조성물 또는 세포 배양을 위한 배지일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0315] 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)중 하나 이상을 필수 성분으로 포함하는 화장료 조성물, 약학적 조성물 또는 세포 배양을 위한 배지도 세포 활성화 효과를 나타낼 수 있다.

[0317] 이하, 실시예를 통하여 본 명세서에 의해 제공되는 조성물과 조성물에 의한 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0319] **[실시예 1] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid) 중 하나 이상을 포함하는 배지 조성물 제작**

[0320] 본 발명자들은 시판 배지의 구성성분 중 일부를 변경한 변형배지 내에 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)를 다양한 함량으로 포함시켜 본 명세서에 의해 제공되는 조성물을 제작하였다.

[0321] 상기 변형배지는 하기 [표 1]에 기재된 그 구성 성분을 포함한다.

[0322] 본 발명자들은 ㈜웰진에서 상기 변형배지를 주문 제작 하여 사용하였다. 본 명세서에 개시된 실시예에서, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 리포산(Lipoic acid)의 배지 내 함량은 몰 농도(mol/L; M)로 표현하였다.

표 1

[0323]

Division	Components	표준명	mg/L	CAS No.
Amino Acids	Glycine	글라이신	50	56-40-6
	L-Arginine	알지닌	105	74-79-3 (L-)
	L-Glutamine	글루타민	292	56-85-9 (L-)
	L-Glutamic Acid	글루타믹애씨드	75	56-86-0 (L-)
	L-Asparagine-H2O	아스파라진	50	5794-13-8 (monohydrate)
	L-Alanine	알라닌	25	56-41-7 (L-)
	L-Aspartic acid	아스파틱애씨드	30	56-84-8 (L-)
	L-Cysteine hydrochloride-H2O	시스테인에이치씨엘	100	7048-04-06,52-89-1
	L-Histidine	히스티딘	31	71-00-1 (L-), 4998-57-6
	L-Isoleucine	아이소류신/이소류신	52.4	73-32-5 (L-)
	L-Leucine	류신	52	61-90-5 (L-)
	L-Lysine	라이신	73	56-87-1 (L-)
	L-Methionine	메티오닌/메치오닌	15	63-68-3
	L-Phenylalanine	페닐알라닌	32	62056-68-2 (L-)
	L-Serine	세린	25	56-45-1 (L-)
	L-Threonine	트레오닌	48	72-19-5 (L-)
	L-Tryptophan	트립토판	10	73-22-3 (L-)
	L-Proline	프롤린	40	147-85-3 (L-)
	L-Valine	발린	46	72-18-4 (L-)
Vitamins	D-Calcium pantothenate	칼슘판토테네이트	1	137-08-6 (D-)
	Folic Acid	폴릭애씨드	1	59-30-3
	Niacinamide	나이아신아마이드	1	98-92-0
	Pyridoxal hydrochloride	피리독신에이치씨엘	1	58-56-0(Pyridoxine HCl)
	Riboflavin	리보플라빈	0.1	83-88-5
	Thiamine hydrochloride	티아민에이치씨엘	1	67-03-08 (Thiamine HCl)
	Vitamin B12	사이아노코발아민	1.36	68-19-9(Cyanocobalamin)
	Ascorbic Acid	아스코빅애씨드	50	50-81-7(L-)
	Biotin	바이오틴	0.1	58-85-5
	i-Inositol	이노시톨	2	87-89-8(myo-inositol/inositol), 643-12-9(D-(+)-chiro-Inositol)

Inorganic Salts	Calcium Chloride (CaCl2) (anhyd.)	칼슘클로라이드	200	10035-04-8
	Magnesium Sulfate (MgSO4) (anhyd.)	마그네슘설페이트	97.67	18939-43-0
	Potassium Chloride (KCl)	포타슘클로라이드	400	7447-40-7
	Sodium Bicarbonate (NaHCO3)	소듐바이카보네이트	2200	144-55-8
	Sodium Chloride (NaCl)	소듐클로라이드	6800	7647-14-5
	Sodium Phosphate monobasic (NaH2PO4-H2O)	소듐포스페이트	140	7558-80-7 (Sodium Phosphate)
Other Components	D-Glucose (Dextrose)	글루코오스	1000	50-99-7 (D-)
	Sodium Pyruvate	소듐파이루베이트	110	113-24-6
Ribonucleosides	Adenosine	아데노신	10	58-61-8
	Guanosine	구아노신	10	118-00-3

[0326] **1-1: 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물 제작**

[0327] 본 발명자들은 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)이 상기 변형배지에 포함된 조성물 Mix Ⅱ, 및 다른 성분들이 상기 변형배지에 포함된 조성물 Mix Ⅰ 및 MixⅢ를 제작하였다.

[0328] 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)은 Sigma Aldrich 에서 구매하였다.

[0329] 하기 [표 2]에 상기 Mix Ⅰ, MixⅡ 및 MixⅢ의 구성 성분 중 상기 변형배지 성분을 제외한 성분들을 개시하였다.

표 2

[0330]

	Product	label	Low conc.	High conc.
Mix Ⅰ	D-pantothenic acid Ca-salt	Vit.B5	5uM	1mM
	L-Ascorbic Acid	Vit.C	0.3mM	1mM
	Pyridoxine Hydrochloride	Vit.B6	5uM	1mM
MixⅡ	DL-6,8 Thioctic Acid	α-Lipoic	0.5uM	500uM
	Ferrous Sulfate	FeSO4	2uM	50uM
MixⅢ	Sodium Metasilicate Nonahydrate	Na2O3	0.3uM	10uM
	Mangan(2) sulfat-Monohydrat(MnSO4 x H2O)	MnSO4	0.001uM	1uM
	Kupfer(2) sulfat-Pentahydrat(CuSO4 · 5H2O)	CuSO4	0.005uM	0.5uM
	Stannous Chloride dihydrate(SnCl2 · 2H2O)	SnCl2	0.0005uM	100uM
	Ammonium heptamolybdate tetrahydrat((NH4)6Mo7O24 · 4H2O)	NH4	0.02uM	0.1uM

[0333] **1-2: 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물 제작 (이하, 실험예(a) 내지 실험예(i))**

[0334] 또한, 본 발명자들은 세부적인 농도평가를 위해 상기 변형배지에 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)의 함량을 달리하여 조성물(실험예(a) 내지 실험예(i))을 제작하였다.

[0335] 하기 [표 3]에 각 조성물(실험예(a) 내지 실험예(i))마다 포함된 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)의 몰농도를 개시하였다.

표 3

[0336]

α-Lipoic	FeSo4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(a)
	200uM	실험예(b)
	400uM	실험예(c)
200uM	0.5uM	실험예(d)
	200uM	실험예(e)
	400uM	실험예(f)
400uM	0.5uM	실험예(g)
	200uM	실험예(h)
	400uM	실험예(i)

[0339] **1-3: 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물 제작 (실험예(1) 내지 실험예(9))**

[0340] 본 발명자들은 줄기세포 성질을 가지는 홀로클론(Holoclone)에 처리하기 위한 9가지 조성물(실험예(1) 내지 실험예(9))을 제작하였으며, 상기 9가지 조성물은 낮은 농도의 황산철(Ferrous Sulfate)을 포함한다.

[0341] 하기 [표 4]에 각 조성물(실험예(1) 내지 실험예(9)) 마다 포함된 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)의 몰농도를 개시하였다.

표 4

[0342]

α-Lipoic	FeSO4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(1)
	50uM	실험예(2)
	100uM	실험예(3)
200uM	0.5uM	실험예(4)
	50uM	실험예(5)
	100uM	실험예(6)
400uM	0.5uM	실험예(7)
	50uM	실험예(8)
	100uM	실험예(9)

[0344] **[실시예 2] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물 처리에 의한 섬유아세포(Fibroblast) 증식 효과**

[0345] 본 발명자들은 당업자에게 일반적인 CCK-8 분석(CCK8-Assay)을 통해 본 명세서에 의해 제공되는 몇몇 조성물의 처리에 의한 섬유아세포의 세포 증식 효과를 확인하였다.

[0346] **2-1: MixⅡ 처리에 의한 섬유아세포 증식 효과**

[0347] 본 발명자들은 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)를 96 well plate에 4000개/well에 동일하게 seeding하고 DMEM+10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 있는 배양배지에서 1일간 배양하였다.

[0348] 배양된 상기 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)를 PBS로 2회 세척한 후, MixⅠ, MixⅡ 및 MixⅢ를 well에 100ul씩 동일하게 분주하여 72시간동안 배양한 후 증식 효과를 확인하였다. 상기 MixⅠ, MixⅡ 및 MixⅢ를 구성하는 물질들을 1M 또는 0.5M stock 농도에서 Low 또는 High 농도에 맞게 각각 희석하여 상기 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)에 처리하였다

[0349] 증식효과는 CCK-8 분석법을 이용하여 측정하였으며, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지에 CCK-8 solution 을 1/10

희석하여 100ul씩 각 well에 분주하고 1~4시간 37℃ incubator 에서 반응시킨 후 450nm 흡광도에서 측정하였다.

[0350] 본 발명자들은 황산철(Ferrous sulfate)과 알파리포산(α-Lipoic acid)이 포함되지 않은 조건(도 1의 0 조건 또는 MixⅠ, MixⅢ 조건)에서 보다, MixⅡ-High 조건일 때 약 2배 이상의 증식 효과가 나타남을 확인하였다.(도 1 참고)

[0352] **2-2: 황산철(Ferrus sulfate)을 포함하는 조성물 또는 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 인간 섬유아세포 증식 정도 확인**

[0353] 본 발명자들은 상술한 MixⅠ, MixⅡ 및 MixⅢ 처리 방법과 동일하게 황산철(Ferrous sulfate)을 변형배지에 포함시킨 조성물 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 변형배지에 포함시킨 조성물에 의한 세포 증식 효과를 확인하였다.

[0354] 본 발명자들은 도 2의 (a)에 나타난 바와 같이, 상기 알파리포산(α-Lipoic acid)을 변형배지에 포함시킨 조성물에 의한 세포 증식 효과가 변형배지+ 10% FBS를 처리한 경우(도 2 (a)의 P.C 조건; 이하, 양성 대조군)일 때 만큼 높지 않은 것을 확인하였다.

[0355] 또한, 본 발명자들은 도 2의 (b)에 나타난 바와 같이, 상기 황산철(Ferrous sulfate)을 변형배지에 포함시킨 조성물에 의한 세포 증식 효과도 양성 대조군(도 2 (b)의 P.C조건)일 때 만큼 높지 않으며, 변형배지만 처리한 경우(도 2 (b)의 0 조건)와 비슷한 것을 확인 하였다.

[0357] **2-3: 실험예(a) 내지 실험예(i)에 의한 인간 섬유아세포 증식 효과**

[0358] 본 발명자들은 상술한 MixⅠ, MixⅡ 및 MixⅢ 처리 방법과 동일하게 실험예(a) 내지 실험예(i)를 각각 상기 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)에 처리하여 세포 증식 효과를 확인하였다.

[0359] 도 3에 나타낸 바와 같이, 상기 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)에 상기 실험예(b) 내지 실험예(i)를 처리 한 경우 변형배지만 처리한 경우(도 3의 0 조건; 이하, 음성 대조군)보다 높은 세포 증식 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0360] 더욱이, 상기 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)에 상기 실험예(e), 실험예(f), 실험예(h) 및 실험예(i)를 처리하는 경우, 음성 대조군보다 약 1.7배 이상의 세포 증식 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0361] 본 발명자들은, 전술한 알파리포산(α-Lipoic acid)을 변형배지에 포함시킨 조성물 에 의한 세포 증식 효과보다, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과(도 2(a) 및 도 3 참고)가 높다는 것을 확인하였다.

[0362] 또한, 전술한 황산철(Ferrous sulfate)을 변형배지에 포함시킨 조성물 에 의한 세포 증식 효과보다, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)의 조합을 포함하는 조성물에 의한 세포 증식 효과(도 2(b) 및 도 3 참고)가 높다는 것을 확인하였다.

[0363] 본 발명자들은 상기 증식 효과가 피부 줄기세포(Skin Stem Cell) 증식에 의한 것인지 확인하기 위하여, 상기 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)이 포함된 조성물([표 4]의 실험예(1) 내지 실험예(9))을 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)로부터 분리한 홀로클론(Holoclone)에 처리하였다.

[0365] **[실시예 3] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물 처리에 의한 피부 줄기세포(Skin stem cell) 증식 효과**

[0366] **3-1: 피부 줄기 세포 수득**

[0367] **(1) 인간 진피 유래 섬유아세포로부터 홀로클론(Holoclone) 분리**

[0368] 홀로클론(Holoclone)은 당업자에게 줄기세포(Stem cell)의 성질을 가지는 세포로 알려져있다.(Nature Medicine volume 12, pages 1397-1402 (2006))

[0369] 따라서, 본 발명자들은 본 출원에서 제공되는 조성물에 피부 줄기세포의 증식이 나타나는 것을 확인하기 위해,

홀로클론(Holoclone)의 증식 효과를 알아보기 위한 실험을 진행하였다.

[0370] 본 발명자들은 하기의 방법을 통해 중앙대 피부과에서 분양 받은 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)(Donor 12 years, Fore skin, passage 3)로부터 홀로클론(Holoclone)을 분리하였다.

[0371] 본 발명자들은 96 well plate에 well당 0.5개(1~2 or not/ well)의 세포가 되도록 seeding한 후 배양 배지 교체 없이 8일 동안 배양하였으며, 배양을 위한 배지로 DMEM+10% FBS를 사용하였다. 본 발명자들은 8일 뒤에 세포 군집이 형성된 well을 관찰하였다.

[0372] 본 발명자들은 상기 세포 군집을 형성한 well 마다 0.25M Trypsin-EDTA처리하여 각각의 세포 lot별로 24 well plate에 옮긴 후 4~6일동안 세포를 증식시켰으며, 이때에도 증식이 빠르게 일어나는 세포만을 선별하였다.

[0374] **(2) 피부 줄기세포 마커(Skin stem cell marker) 확인**

[0375] 본 발명자들은 상기 선별한 세포(홀로클론(Holoclone))로부터 진피 줄기세포(Dermal stem cell) 마커(CD29(+), CD34(-), CD44(+), CD90(+), CD105(+))를 확인하였다.(도 4 및 도 5 참고). 이러한 결과를 통해, 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)로부터 분리해낸 상기 홀로클론(Holoclone)이 피부 줄기세포의 성질을 가지는 것을 확인 하였다.

[0376] 본 발명자들은 상기 홀로클론(Holoclone)을 25T Flask에 배양하고, 본 명세서에 의해 제공되는 몇몇 조성물을 처리하여 증식 효과를 확인하였다.

[0378] **3-2: 황산철(Ferrus sulfate)을 포함하는 조성물 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 피부 줄기세포 증식 정도 확인**

[0379] 본 발명자들은 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)(Donor 12 years, Fore skin, passage 3)로부터 분리한 상기 홀로클론(holoclone)을 96 well plate에 4000개/well에 동일하게 seeding하고 DMEM+10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 있는 배양배지에서 1일간 배양하였다.

[0380] 상기 배양된 홀로클론(Holoclone)을 PBS로 2회 세척한 후, 황산철(Ferrous sulfate)을 변형배지에 포함시킨 조성물 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 변형배지에 포함시킨 조성물을 well에 100ul씩 동일하게 분주하여 72시간동안 배양한 후 증식 효과를 확인하였다.

[0381] 상기 홀로클론(Holoclone)의 증식 효과는 당업자에게 일반적인 CCK-8 분석(CCK8-Assay)을 통해_확인하였다.

[0382] 10% FBS+ 변형배지(이하, 양성 대조군)(도 6의 FBS 조건)가 처리된 경우와 비교했을 때, 황산철(Ferrous sulfate)만 변형배지에 포함된 조성물이 처리되는 경우에는 홀로클론(Holoclone) 증식 효과가 나타나지 않았다(도 6 참고).

[0383] 또한, 알파리포산(α-Lipoic acid)만 변형배지에 포함된 조성물이 처리된 경우도 상기 양성 대조군(도 7의 FBS 조건)만큼 홀로클론(Holoclone)의 세포 증식 효과가 나타나지 않았다. (도 7 참고)

[0385] **3-3: 실험예(1) 내지 실험예(9)에 의한 피부 줄기 세포 증식 효과 측정**

[0386] **(1) 홀로클론(Holoclone) 증식 효과 확인**

[0387] 본 발명자들은 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)(Donor 12 years, Fore skin, passage 3)로부터 분리한 상기 홀로클론(Holoclone)을 96 well plate에 4000개/well에 동일하게 seeding하고 DMEM+10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 있는 배양배지에서 1일간 배양하였다.

[0388] 상기 배양된 홀로클론(Holoclone)을 PBS로 2회 세척한 후, 전술한 실험예(1) 내지 실험예(9)의 조성물을 well에 100ul씩 동일하게 분주하여 72시간동안 배양한 후 증식 효과를 확인하였다.

[0389] 본 발명자들은 음성 대조군으로서 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하지 않는 변형배지(도 8의 0조건)만을 well에 100㎕ 분주하여 증식효과를 확인하였다. 또한 본 발명자들은 양성 대조군으로서 10% FBS+변형배지(도 8의 FBS 조건)를 well에 100㎕ 분주하여 증식효과를 확인하였다.

[0390] 본 발명자들은 상기 실험예(4) 및 실험예(7)에 의한 홀로클론(Holoclone)의 증식 효과는 음성 대조군에 비해 2.5배 이상 높으며, 상기 실험예(5), 실험예(6), 실험예(8) 및 실험예(9)에 의한 홀로클론(Holoclone)의 증식효과는 상기 음성 대조군에 비해 약 3.5배 이상 높다는 것을 확인 하였다.(도 8 참고)

[0391] 더욱이, 상기 실험예(5), 실험예(6), 실험예(8) 및 실험예(9)에 의한 홀로클론(Holoclone)의 증식 효과는 상기 양성 대조군의 증식 효과와 비슷하거나 더 높다는 것을 확인하였다.

[0393] **(2) 홀로클론(Holoclone) 증식 효과와 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식 효과 비교**

[0394] 본 발명자들은 본 발명에 의해 제공되는 조성물에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast) 증식효과보다 홀로클론(Holoclone)의 증식효과가 더 크다는 것을 CCK-8 분석(CCK-8 Assay)를 통해 확인하였다.

[0395] 상기 실험예(8)을 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)에 처리한 경우 변형배지만 처리한 경우(음성 대조군) 보다 1.88배의 증식효과가 나타났다.

[0396] 이와 비교하여, 상기 실험예(8)을 피부 줄기세포 성질을 가지는 홀로클론(holoclone)에 처리한 경우 상기 음성 대조군 보다 2.99배의 증식효과가 나타났다. (도 9 참고)

[0397] 본 발명자들은 상기 실험예(8)에 의해 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)의 증식 효과도 나타나지만, 홀로클론(Holoclone)의 증식 효과가 2배 정도 더 높은 것을 확인하였다.

[0399] **3-4: 다양한 근원(source) 유래의 성체 줄기세포 증식 여부**

[0400] 본 발명자들은 전술한 홀로클론(Holoclone)의 증식 효과에 비추어, 본 출원에 의해 제공되는 조성물에 의해 피부 줄기세포(Skin stem cell)의 증식 효과가 나타난다는 것을 확인하였다.

[0401] 본 발명자들은 상기 조성물이 피부 줄기세포(Skin stem cell)에 특이적으로 영향을 미친다는 것을 확인하기 위하여, 골수 유래 줄기세포 및 지방 유래 줄기세포에 상기 조성물을 처리하는 실험을 진행하였다.

[0402] 상기 성체 줄기세포로 사용된 골수 유래 중간엽 줄기세포(Donor:Male 65 years), 지방 유래 중간엽 줄기세포(Donor:Male 47 years)는 모두 Promo cell 에서 구매하여 사용하였다.

[0403] 본 발명자들은 상기 실험예(1) 내지 실험예(9)를 처리하여 상기 골수 유래 줄기세포 및 지방 유래 줄기세포를 배양시켰다. 또한, 본 발명자들은 음성 대조군으로 상기 변형배지(도 10의 0, 도 11의 0)만 상기 골수 유래 줄기세포 및 지방 유래 줄기세포에 처리하였다.

[0404] 본 발명자들은 골수 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 유래 중간엽 줄기세포를 96 well plate에 4000개/well에 동일하게 seeding하고 MEMα배지 + 10% FBS, 0.5% Gentamicin 있는 배양배지에서 1일간 배양하였다. 상기 배양된 줄기세포를 PBS로 2회 세척한 후 황산철(Ferrous sulfate)과 리포산(lipoic acid)이 포함된 실험예(1) 내지 실험예(9)를 well에 100ul씩 동일하게 분주하여 72시간동안 배양한 후 상기 골수 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 유래 중간엽 줄기세포의 증식 효과를 확인하였다.

[0405] CCK-8 분석(CCK8-Assay)을 통해 증식 효과를 분석해본 바, 상기 골수 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 유래 중간엽 줄기세포의 증식효과는 음성 대조군과 비슷하거나 더 낮았다.(도 10 및 도 11 참고)

[0407] **[실시예 4] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 상처 치유(Wound healing) 효과 확인**

[0408] 본 발명자들은 황산철(Ferrous sulfate)과 알파리포산(α-Lipoic acid)이 포함된 상기 MixⅡ에 의한 상처 치유(Wound Healing) 효과가 나타나는지 확인하기 위해 하기의 실험을 하였으며, 비교군으로 상기 MixⅠ조성물 및 MixⅢ 조성물, 상기 변형배지(음성 대조군) 및 10% FBS+ 상기 변형배지 (양성 대조군)을 사용하였다.

[0409] 본 발명자들은 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)에 스크래치를 주고 상기 조성물을 처리해 48시간이 경과한 후 상처 치유(Wound healing)효과를 확인했다.

[0410] 도 12의 N.Cont은 상기 음성대조군을 나타내며, 도 12의 P.Cont은 상기 양성대조군을 나타낸다. 도 12에

따르면, MixⅡ-low를 처리한 경우, 양성 대조군 조건만큼 상처 치유(Wound Healing) 효과가 나타났다.

[0412] **[실시예 5] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 세포 노화 마커 발현 억제 확인**

[0413] 본 발명자들은 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 줄기세포 노화 억제 여부를 확인하기 위해서 하기의 실험을 하였다.

[0414] 본 발명자들은 60ø dish에 20000/㎠ 홀로클론(Holoclone)을 seeding한 후 DMEM +10% FBS, 1% P/S에서 하루동안 배양하였다.

[0415] 상기 배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후 DMEM Phenol red 없는 media를 0.02ml/㎠ 을 채워 UV 조사기 (BLX-254, VILBER Lourmat,France)를 이용하여 UVA 6J에 노출시킨 후, 웨스턴 블랏(Western blot)으로 상기 세포에서 노화마커(P21,p-P53)의 발현을 확인하였다.(도 13의 UVA 6J, C조건).

[0416] 본 발명자들은 상기 홀로클론(Holoclone)을 UVA 6J에 노출시킨 후 웨스턴 블랏(Western blot) 결과에 의해 상기 P21 및 상기 p-P53의 발현 양이 증가한 것을 확인하였다.

[0417] 본 발명자들은 상기 UVA 6J에 노출된 세포를 상기 실험예(8)에서 72시간 배양한 후 상기 P21 및 상기 p-P53의 발현 양이 UVA 6J 에 노출되기 전 만큼 감소한 것을 확인하였다.(도 13의 UVA 6J, 실험예(8) 조건)

[0419] **[실시예 6] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 미백 효과 확인**

[0420] 본 발명자들은 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함하는 조성물에 의한 미백효과를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 진행하였다.

[0421] 본 발명자들은 경희대학교로부터 분양받은 마우스 멜라노사이트(Mouse Melanocyte)(B16-F1)에 멜라닌 색소 합성을 유도하기 위해 α-MSH를 처리하였고, α-MSH를 처리하지 않은 경우와 비교하여 상기 α-MSH를 처리한 경우 멜라닌 수치가 높아진 것을 확인하였다.

[0422] 하기 [표 5]에 α-MSH를 처리한 경우의 멜라닌 수치([표 5]의 음성 대조군 2)를 기준(1.00 값)으로하여, α-MSH를 처리하지 않은 경우 ([표 5] 음성 대조군 1), 실험예(8)을 처리한 경우, 비교예들을 처리한 경우의 상대적인 멜라닌 수치를 기재하였다.

[0423] 상기 α-MSH가 처리된 B16-F1에 상기 실험예(8)을 처리한 경우, 비교예1(알파리포산(α-Lipoic acid) 200μM)을 처리한 경우 보다 상대적으로 멜라닌 수치가 낮은 것을 확인하였다.

[0424] 또한, 상기 실험예(8)을 α-MSH가 처리된 B16-F1에 처리한 경우의 멜라닌 수치는 음성 대조군 2 보다 낮은 것을 확인하였다.

[0425] 이를 통해, 본 발명자들은 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid) 조합시 단독으로 알파리포산(α-Lipoic acid)을 처리하는 경우 보다 미백 효과가 더 좋다는 것을 확인하였다.

표 5

[0426]

α-MSH(-)	α-MSH(+)				
음성 대조군 1	음성 대조군 2	실험예(8)	비교예1	비교예2	비교예3
		Ferrous sulfate (0.5 μM)+α-Lipoic acid (200μM)	α-Lipoic acid (200μM)	RSV 50μM	Arbutin 500μM
0.86	1.00 (기준)	0.79	0.93	0.79	0.91

[0428] **[실시예 7] 황산철(Ferrous sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)을 포함한 화장료 조성물 제작**

[0429] 본 발명자들은 하기의 [표 6]과 같은 조성의 화장료 조성물을 제조하였다.

[0430] 상기 화장료 조성물의 제조방법은 다음과 같다.

[0431] 1) 하기 표의 2 내지 7(이하, A) 와 8 내지 10(이하, B) 을 각각 75° C 까지 가열한다.

[0432] 2) B 에 A 를 조금씩 첨가하며 7000 rpm 속도로 유화교반 한다.

[0433] 3) 하기 표의 1 및 11을 첨가후 2분간 유화교반한다.

[0434] 4) 1 분간 2500 rpm 으로 교반하여 조성물에 공기를 탈기한다.

[0435] 5) 조성물이 담긴 비이커를 얼음물에 담그어 28 - 30 ° C 까지 냉각한다.

[0436] 6) 제조된 조성물을 상온에 24시간 방치하여 안정화 한다.

표 6

[0438]

순번	성분	중량%
1	실험예(1) 또는 실험예(9)	최대 81
2	스테아린산	1.0
3	세토스테아릴 알코올	0.7
4	모노스테아린산글리세린	0.5
5	유동파라핀	5.0
6	모노스테아린산소르비탄	0.3
7	스쿠알란	3.5
8	정제수	To 100
9	농글리세린	6.5
10	히아루로닉엑시드추출물	0.5
11	세피겔 350	0.7
12	향	적량

[0441] **[실시예 8] 세포 배양에 사용될 수 있는 다양한 성분을 포함한 조성물에 의한 인간 섬유아세포 증식 효과**

[0442] 본 발명자들은 황산철(Ferrous Sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)이 아닌 일반적으로 세포 배양을 위해 사용될 수 있는 다른 성분 (이하, "세포 배양 성분")에 의해서도 상기 세포 증식 효과가 나타날 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 하기의 실험을 진행하였다.

[0443] 본 발명자들은 황산철(Ferrous Sulfate) 및 알파리포산(α-Lipoic acid)가 아닌 세포 배양 성분을 DMEM 기본배지와 혼합한 조성물을 이용해서 세포증식 효과를 확인하는 실험을 진행했다. 각각의 세포 배양 성분의 상기 조성물 내 기준 함량은 도 14 내지 도 17의 각 그래프에 개시되어 있다.

[0444] 상기 세포 배양 성분은 L-아스파틱애씨드 (L-Aspartic acid), L-알라닌(L-Alanine), 프롤린(Proline), 판토텐산 칼슘염(Pantothenic acid Ca-salt), 피리독신에이치씨엘(Pyridoxine hydrochloride), L-아스코르브산(L-Ascorbic acid), L-아스파라긴 모노하이드레이트(L-asparagine monohydrate), L-글루타믹애씨드(L-Glutamic acid), D-비오틴(D-biotin), 징크썰페이트 헵타하이드레이트(Zinc Sulfate Heptahydrate), 리보플라빈(Riboflavin)이며, 이들은 Sigma Aldrich에서 구매하였다. 상기 DMEM 기본배지는 Hyclone쩨 에서 구매하였다.

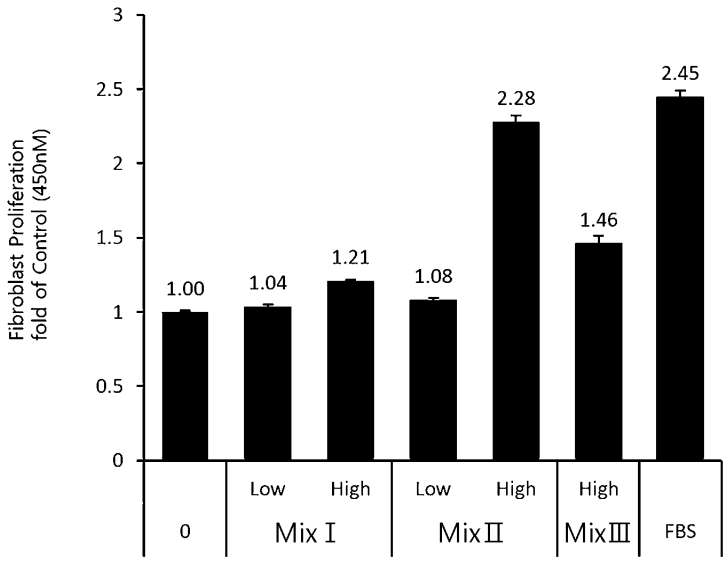
[0445] 상기 조성물은 각각 인간 섬유아세포(Human primary fibroblast) 4000/well에 48시간 동안 single product treatment 되었다. 또한, 본 발명자들은 음성 대조군으로 DMEM 기본배지를 처리하였으며, 이는 도 14 내지 도 17에서 0 조건으로 표현 되었다.

[0446] 상기 음성 대조군과 비교하였을 때, 상기 세포 배양 성분이 포함된 조성물들에 의한 인간 섬유아세포(Human Primary Fibroblast)의 증식 효과가 높게 나타나지 않았다.(도 14 내지 도 17 참고)

[0447] 이들 실시예는 오로지 본 명세서에 의해 개시되는 내용을 예시하기 위한 것으로서, 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

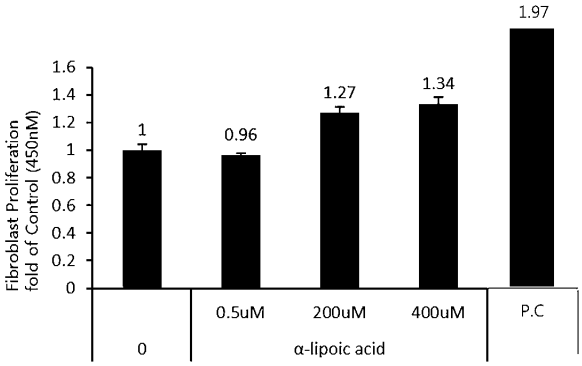
도면

도면1

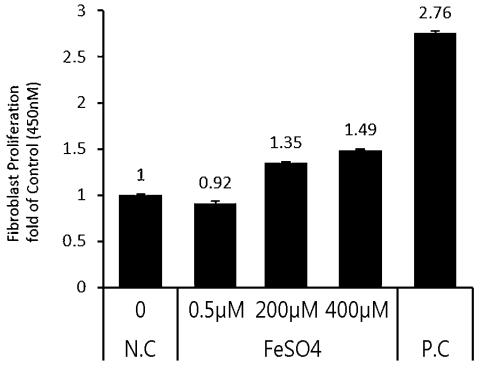


도면2

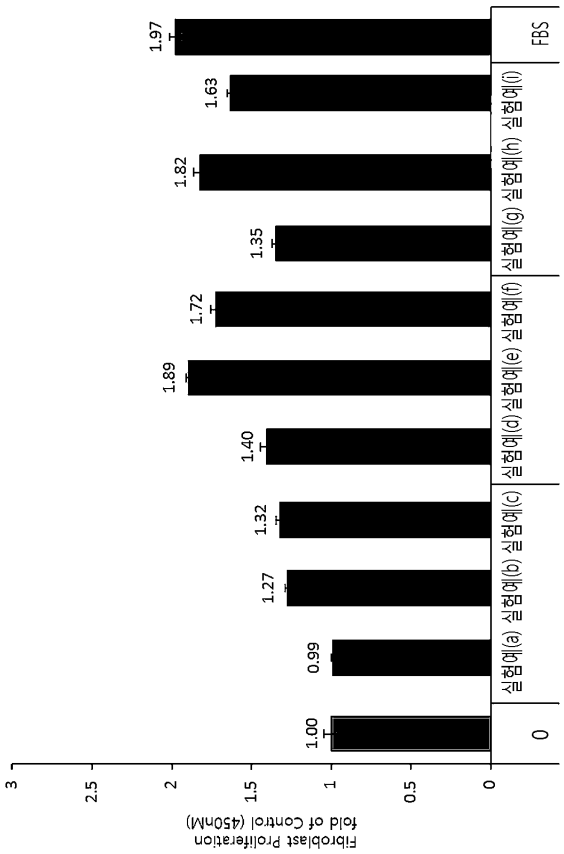
(a)


Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
0.96
1.27
1.34
1.97
0.5uM
200uM
400uM
P.C
0
α-lipoic acid

(b)


Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
0.92
1.35
1.49
2.76
0
0.5μM
200μM
400μM
N.C
FeSO4
P.C

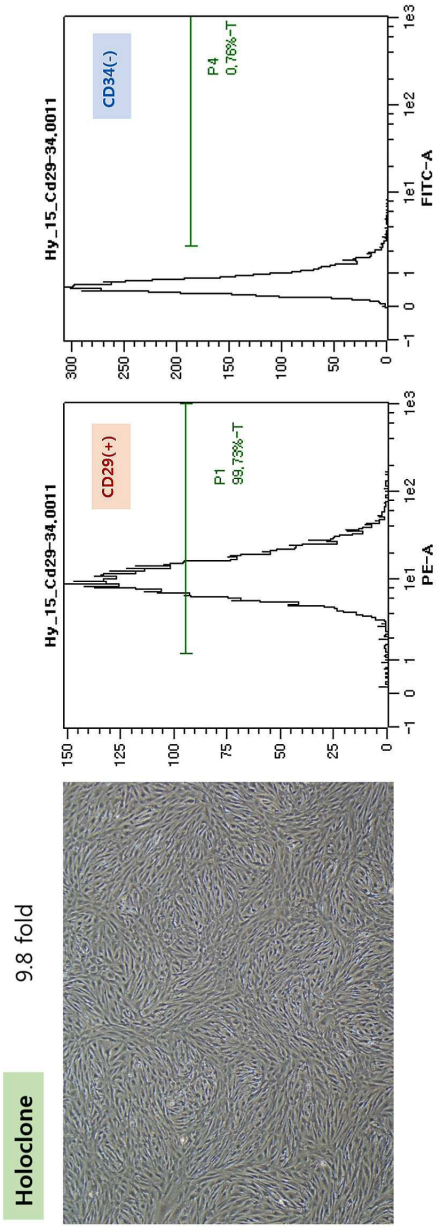
도면3



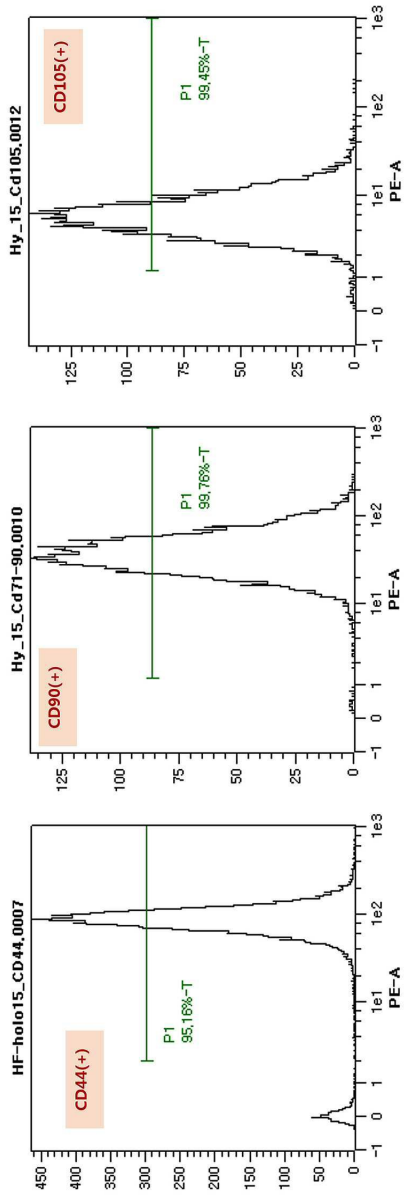
[표 3]

α-Lipoic	FeSo4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(a)
	200uM	실험예(b)
	400uM	실험예(c)
200uM	0.5uM	실험예(d)
	200uM	실험예(e)
	400uM	실험예(f)
400uM	0.5uM	실험예(g)
	200uM	실험예(h)
	400uM	실험예(i)

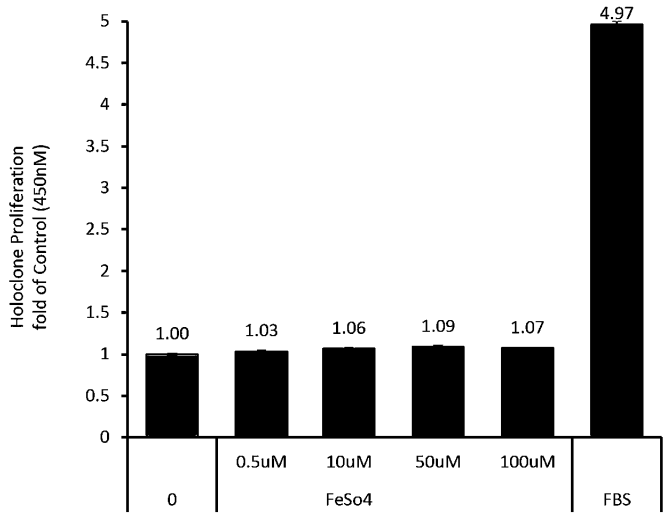
도면4


Holoclone
9.8 fold
Hy_15_Cd29-34_0011
CD29(+)
P1
99,73%-T
PE-A
Hy_15_Cd29-34_0011
CD34(-)
P4
0,76%-T
FITC-A

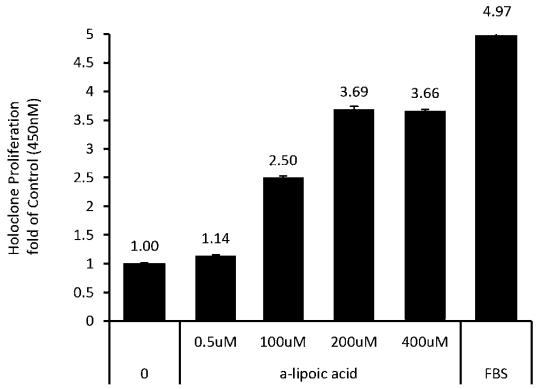
도면5


HF-holo15_CD44_0007
CD44(+)
P1
95.16%-T
PE-A
Hy_15_Cd71-90_0010
CD90(+)
P1
99.76%-T
PE-A
Hy_15_Cd105_0012
CD105(+)
P1
99.45%-T
PE-A

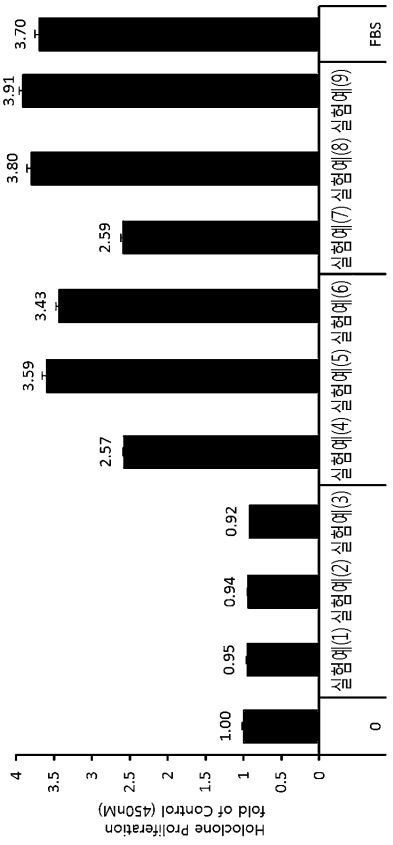
도면6


Holoclone Proliferation
fold of Control (450nM)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.00
1.03
1.06
1.09
1.07
4.97
0
0.5uM
10uM
50uM
100uM
FBS
FeSo4

도면7


Holoclone Proliferation
fold of Control (450nM)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.00
1.14
2.50
3.69
3.66
4.97
0
0.5uM
100uM
200uM
400uM
a-lipoic acid
FBS

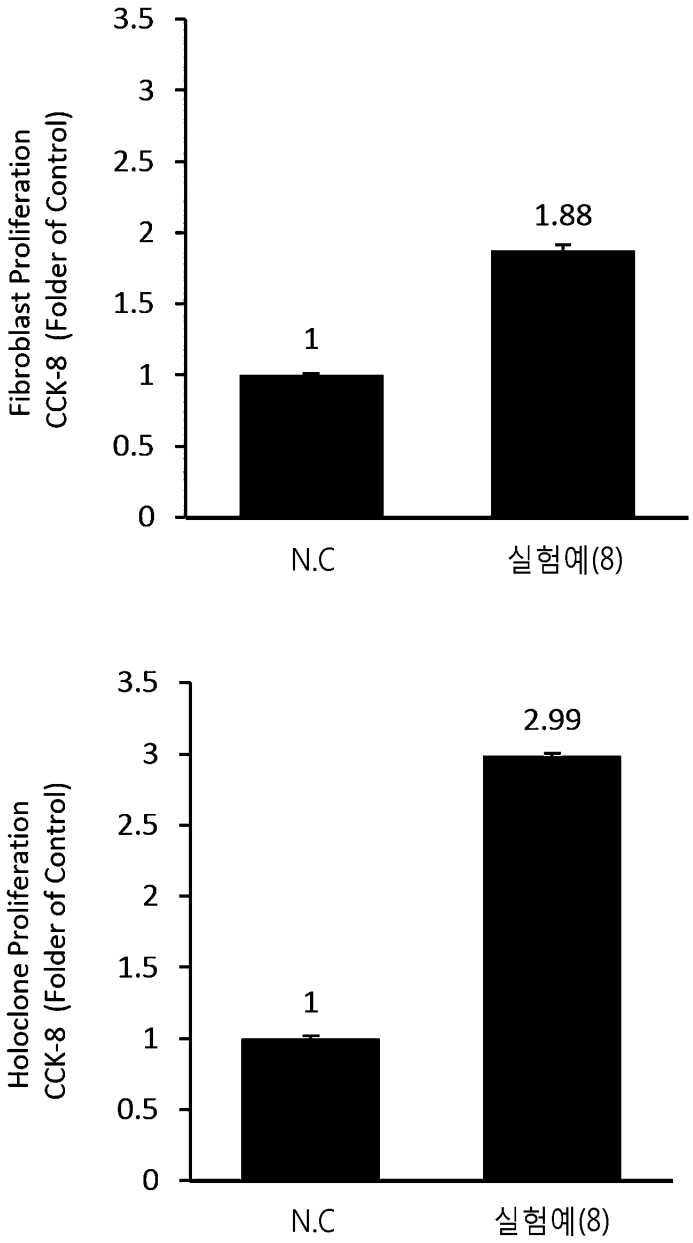
도면8



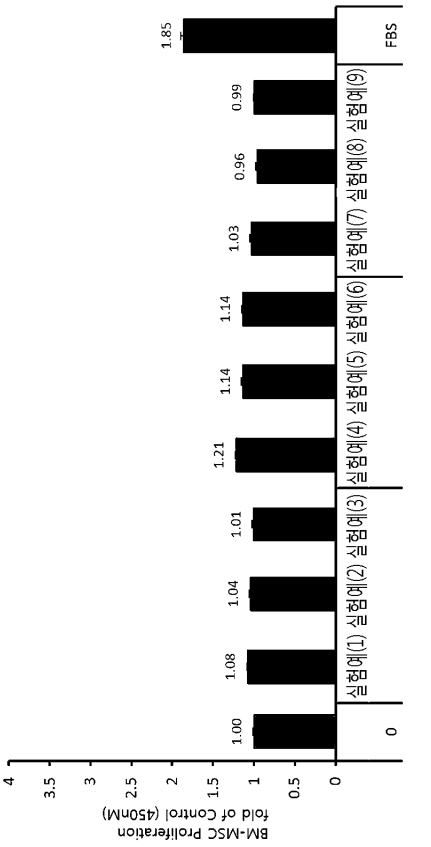
[표4]

α-Lipoic	FeSO4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(1)
	50uM	실험예(2)
	100uM	실험예(3)
200uM	0.5uM	실험예(4)
	50uM	실험예(5)
	100uM	실험예(6)
400uM	0.5uM	실험예(7)
	50uM	실험예(8)
	100uM	실험예(9)

도면9


Fibroblast Proliferation
CCK-8 (Folder of Control)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.88
1
N.C
실험예(8)
Holoclone Proliferation
CCK-8 (Folder of Control)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2.99
1
N.C
실험예(8)

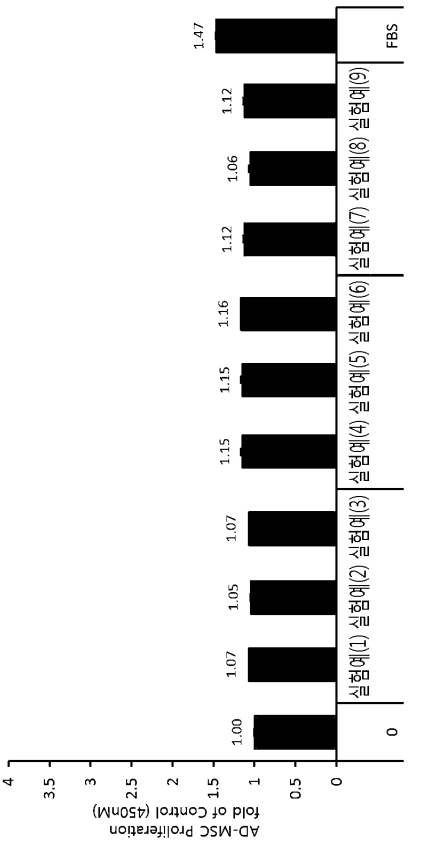
도면10



[표4]

α-Lipoic	FeSO4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(1)
	50uM	실험예(2)
	100uM	실험예(3)
200uM	0.5uM	실험예(4)
	50uM	실험예(5)
	100uM	실험예(6)
400uM	0.5uM	실험예(7)
	50uM	실험예(8)
	100uM	실험예(9)

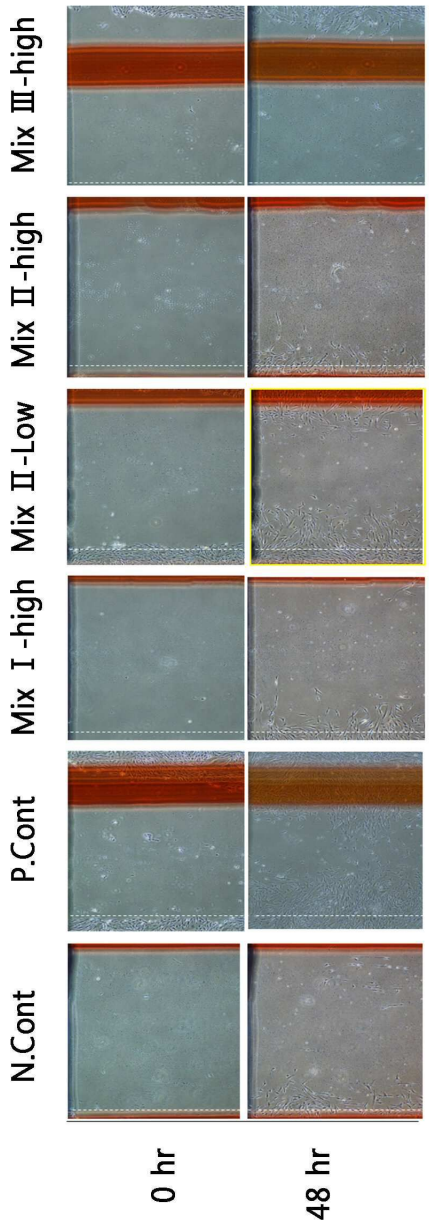
도면11



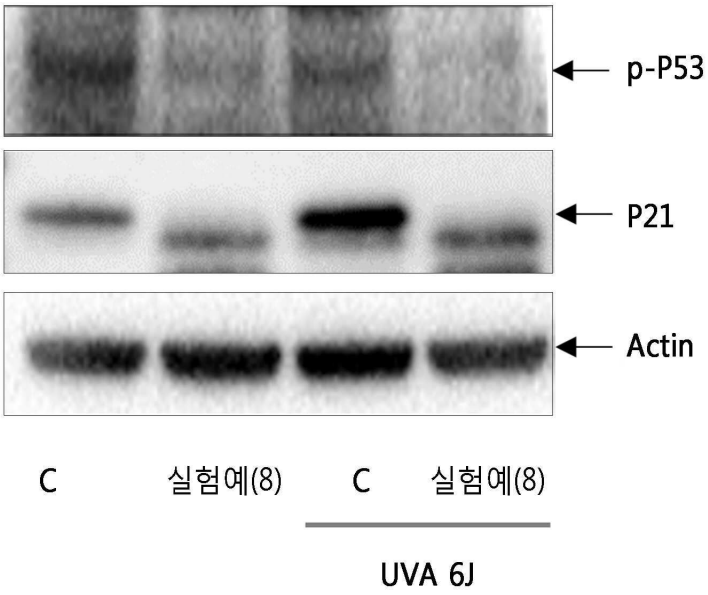
[표4]

α-Lipoic	FeSO4	Label
0.5uM	0.5uM	실험예(1)
	50uM	실험예(2)
	100uM	실험예(3)
200uM	0.5uM	실험예(4)
	50uM	실험예(5)
	100uM	실험예(6)
400uM	0.5uM	실험예(7)
	50uM	실험예(8)
	100uM	실험예(9)

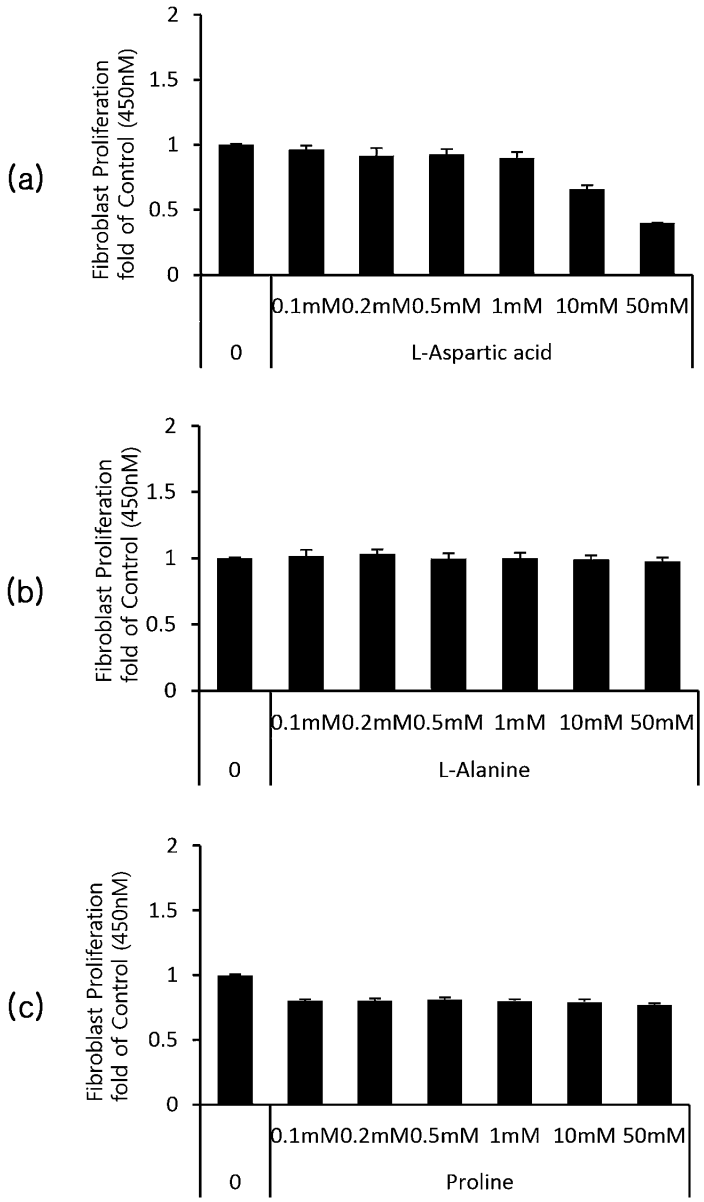
도면12



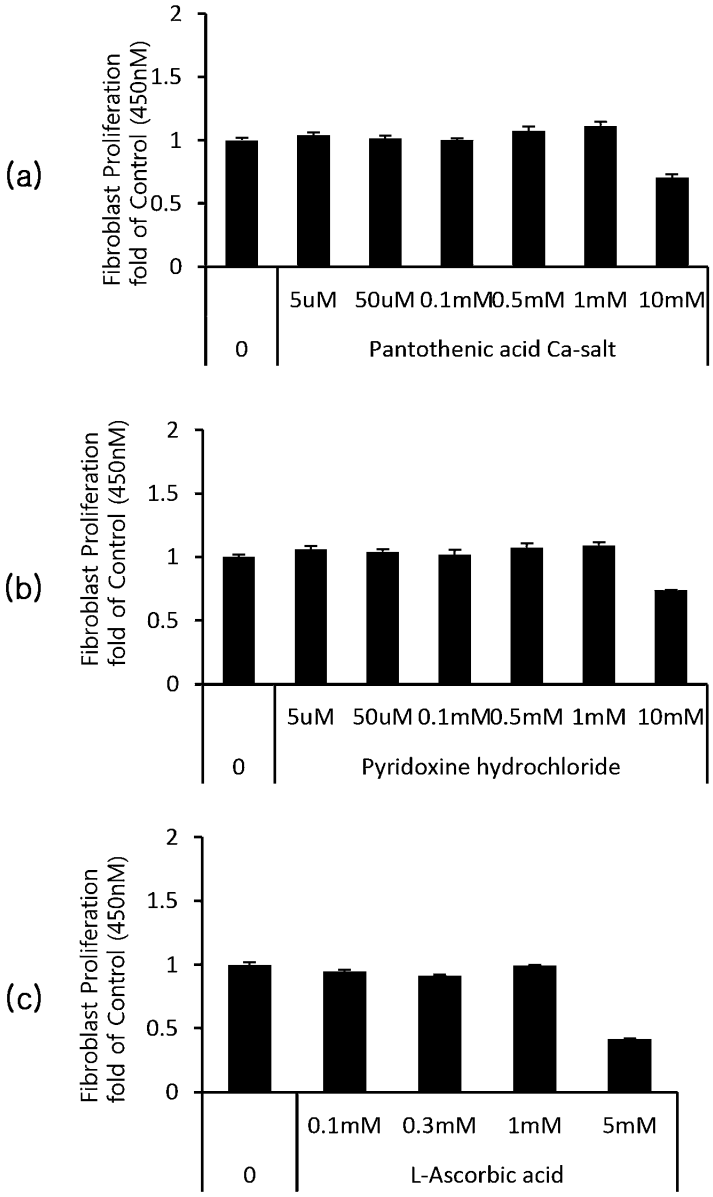
도면13



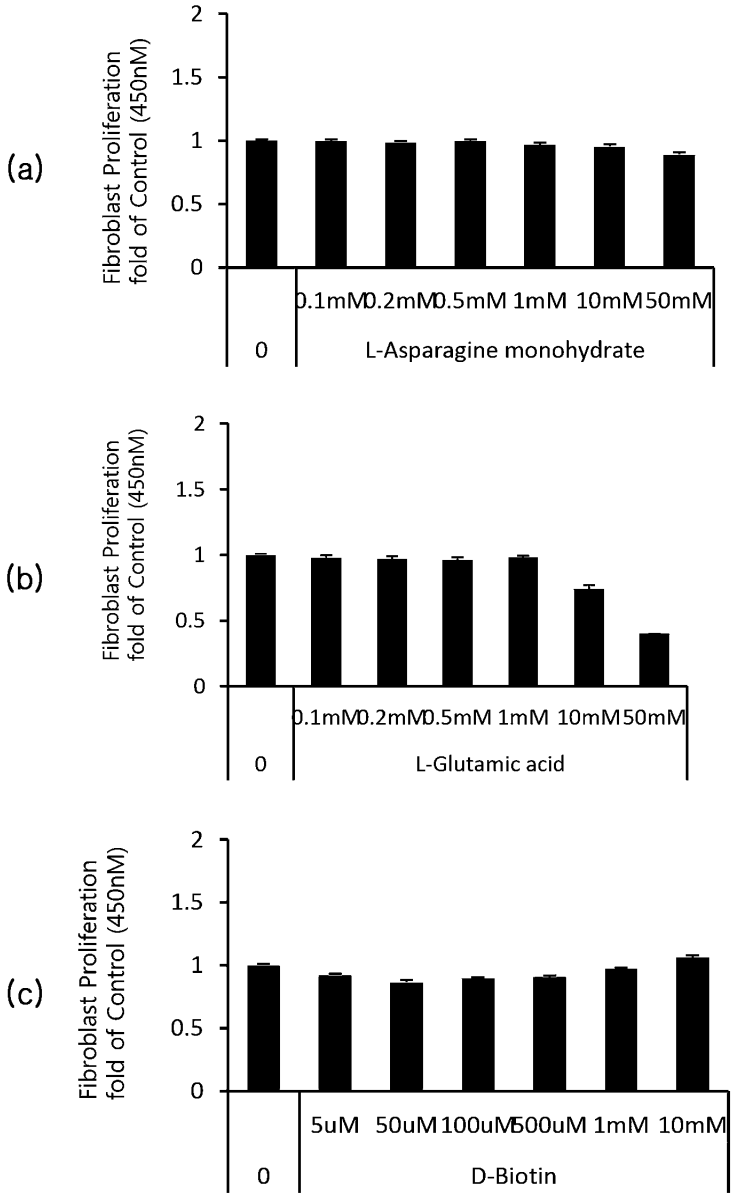
도면14


(a)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.1mM
0.2mM
0.5mM
1mM
10mM
50mM
L-Aspartic acid
(b)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.1mM
0.2mM
0.5mM
1mM
10mM
50mM
L-Alanine
(c)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.1mM
0.2mM
0.5mM
1mM
10mM
50mM
Proline

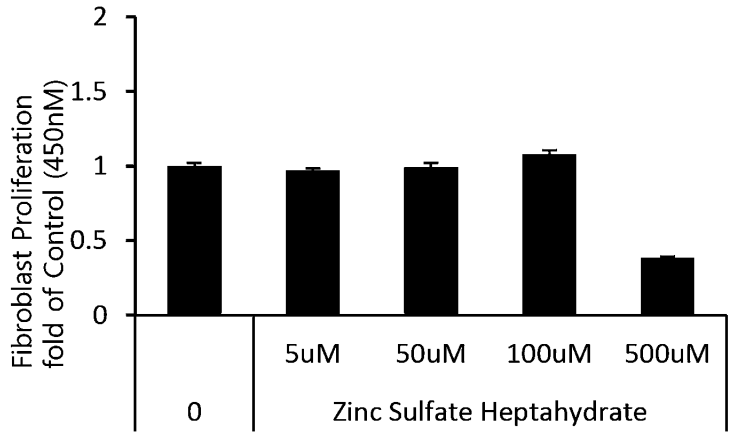
도면15


(a)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
5uM
50uM
0.1mM
0.5mM
1mM
10mM
Pantothenic acid Ca-salt
(b)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
5uM
50uM
0.1mM
0.5mM
1mM
10mM
Pyridoxine hydrochloride
(c)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.1mM
0.3mM
1mM
5mM
L-Ascorbic acid

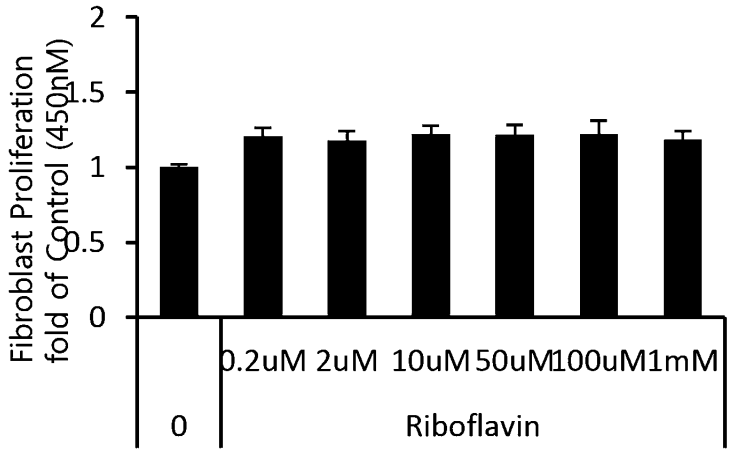
도면16


(a)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.1mM
0.2mM
0.5mM
1mM
10mM
50mM
L-Asparagine monohydrate
(b)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.1mM
0.2mM
0.5mM
1mM
10mM
50mM
L-Glutamic acid
(c)
Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
5uM
50uM
100uM
500uM
1mM
10mM
D-Biotin

도면17


Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
5uM
50uM
100uM
500uM
Zinc Sulfate Heptahydrate

(a)


Fibroblast Proliferation
fold of Control (450nM)
2
1.5
1
0.5
0
0
0.2uM
2uM
10uM
50uM
100uM
1mM
Riboflavin

(b)