

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2010년 9월 23일 (23.09.2010)

PCT

(10) 국제공개번호  
WO 2010/107185 A2

- (51) 국제특허분류:  
A61K 35/12 (2006.01) A61K 8/98 (2006.01)  
A61P 17/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/001101
- (22) 국제출원일: 2010년 2월 23일 (23.02.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2009-0017227 2009년 2월 27일 (27.02.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):  
(주)차바이오엔디오스텍 (CHABIO&DIOSTECH CO., LTD.) [KR/KR]; 경기도 용인시 처인구 남사면 북리 151-21, 449-884 Kyunggi-do (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정형민 (CHUNG, Hyung Min) [KR/KR]; 서울시 강남구 논현동 285 동부센트레빌 103-1701, 135-833 Seoul (KR). 김주미 (KIM, Ju Mi) [KR/KR]; 경기도 용인시 수지구 풍덕천 1동 보원아파트 105-1505, 448-761 Kyunggi-do (KR). 이민지 (LEE, Min Ji) [KR/KR]; 서울시 송파구 풍납1동 131-16호, 138-041 Seoul (KR). 홍기성 (HONG, Ki

Sung) [KR/KR]; 서울시 강남구 개포동 주공 1단지 53동 112호, 135-966 Seoul (KR). **성종혁 (SUNG, Jong Hyuk)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 서현동 풍림아이원 C1525, 463-050 Kyunggi-do (KR).

(74) 대리인: **사광영 (SA, Kwang Young)**; 서울시 강남구 역삼1동 642-1 현대벤처텔 1610호, 135-910 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

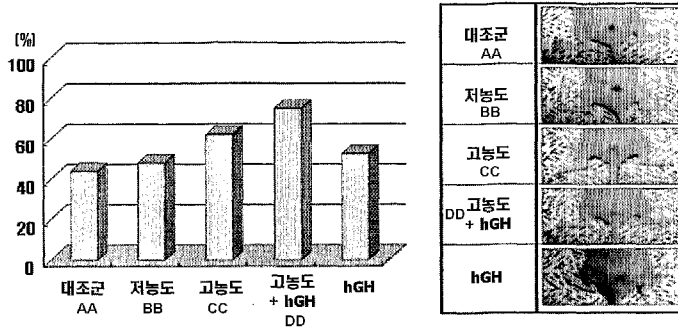
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR SKIN REGENERATION, CONTAINING A SECRETION IN THE CULTURE OF AN EMBRYONIC STEM CELL-DERIVED ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL OR FRACTIONS THEREOF, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 또는 이의 분획물을 포함하는 피부재생용 조성물 및 이의 용도

[Fig. 3a]



AA ... Control group  
BB ... Low concentration

CC ... High concentration  
DD ... High concentration + hGH

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for skin regeneration, using a culture medium or a secretion in the culture of an embryonic stem cell-derived endothelial progenitor cell, and to the use thereof. As the present invention uses the secretion in the culture as a medicine and not the embryonic stem cell-derived endothelial progenitor cell itself, the risk of teratoma formation is prevented, and angiogenic activity is promoted to achieve improved effectiveness in healing wounds and burn wounds. The composition of the present invention, when used as a material in cosmetics, increases collagen synthesis and thus prevents skin aging. Particularly, the composition of the present invention in which the secretion in the culture is concentrated into a high concentration provides superior wound-healing effects as compared to a conventional human growth hormone (hGH).

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2010/107185 A2



NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:  
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

---

본 발명은 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양액 또는 배양 분비물을 이용한 피부재생용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명은 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 자체가 아닌 배양 분비물을 치료제로 이용하므로 기형종(teratoma) 형성의 위험성이 없고, 신생혈관 생성능력을 촉진시켜 창상치료, 화상창상치료에 효과적이며, 이를 화장품 원료로 이용하는 경우 콜라겐 생성을 증대시켜 피부노화를 방지하는 효과를 제공한다. 특히, 상기 배양 분비물을 고농도로 농축시킨 본 발명의 조성물은 종래 hGH(human growth hormone)에 비해 높은 창상치료효과를 제공한다.

## 명세서

### 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 또는 이의 분획물을 포함하는 피부재생용 조성물 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포(embryonic stem cell derived endothelial progenitor cells) 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 포함하는 피부재생용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세히는 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포의 배양액에서 분리된 생물학적 단백질을 창상, 화상창상에 적용하거나, 피부성형에 적용시켜 피부재생을 통하여 치료하는 한편, 주름개선 또는 피부노화방지용 기능성 화장품으로 이용하는 기술에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 현재의 창상치료(wound healing) 및 화상창상치료(burn wound healing)는 대부분 치료제용 드레싱 거즈나 인공 피부이식을 통한 치료법이 널리 행해지고 있다. 치료제용 드레싱 거즈의 경우, 합성 및 천연 고분자로 이루어져 있는 거즈에 상처치유를 위한 유효 인자들이 흡수되어 있어 유효 인자의 전달과 감염 위험이 적은 면에서 유용한 측면이 있으나, 지속적인 드레싱 거즈의 교환이 수반되지 않을 경우 오히려 감염 위험이 증가할 가능성을 지니며, 거즈 교환 시 상처 부위를 재 자극할 우려를 가지고 있다.
- [3] 큰 화상이나 외과수술시 창상에 적용되는 인공피부는 합성 고분자와 천연 고분자로 이루어져 있어 대개 위층인 실리콘은 체액이 증발하여 소실되는 것을 막고, 아래층은 콜라겐이나 황산 콘드로이친으로 구성되어 새로운 혈관과 결합조직의 재생을 유도하며, 피부의 각층을 구성하는 세포를 채취하여 시험관 내에서 확장시킨 후 적절한 합성고분자 또는 천연고분자 등으로 만들어진 인공피부 지지체에 접종하여 조직 형성을 유도한 뒤 다시 환자에 이식하는 방법이 이용되어 지고 있다. 하지만, 인공피부를 이용한 치료법들은 상처회복측면에서 볼 때, 합성 및 천연 고분자의 생체 적합성 여부에 따라 일정한 결과를 도출해 내지 못하고 있는 실정이며, 특히 배양피부의 경우 표피세포의 안정적인 공급측면에서 어려움이 있고, 세포내 면역 관련 성분으로 인해 면역 거부반응의 위험이 있으며, 상처 부위로의 생착 과정에서 표피-진피 간 결합이 불안정한 치명적 단점을 갖고 있다.
- [4] 정상적인 상처의 회복은 상처 후 응고기, 염증기, 세포이주기 및 조직 재편기 등의 과정을 통해 이루어지며, 염증기에 다량 분비되어지는 EGF, FGF, VEGF, PDGF, TGF 등 다양한 사이토카인들의 영향으로 신생 혈관 작용, 콜라겐의 합성, 섬유아 세포의 이주등의 작용이 수반되어 진다.
- [5] 모든 과정들은 궁극적으로 국소 상처 부위에서 분비된 여러 사이토카인이

새로운 혈관 신생을 촉진하여, 신생된 혈관을 통해 상처회복에 필요한 각종 성장인자, 염증세포, 기질세포 및 피부전구세포 등을 실어 나르며, 또한 조직파편의 제거 및 육아조직 등의 형성을 촉진하며 전반적인 상처 회복을 주도하고 있다.

- [6] 중간엽 줄기세포 유래의 분비물을 이용한 창상치료의 효과는 이미 보고 된 바 있다. Stephen M 등은 골수 줄기세포 유래의 혈관형성전구세포를 이용하여 허혈성 질환으로 인한 창상 치료에 그 효과를 입증하였으며 (Stephen M. Bauer, Lee J. Goldstein, Richard J. Bauer, Haiying Chen, Mary Putt, ScD, and Omaid C. Velazquez, The bone marrow-derived endothelial progenitorcell response is impaired in delayed wound healing from ischemia. Journal of vascular surgery (2006) 43(1):134-41), Liwen Chen 등은 성체 줄기세포인 골수 유래 중간엽 줄기 세포 분비물을 이용하여 창상 치료 효과를 입증한 바 있다(Liwen Chen, Edward E. Tredget, Philip Y. G. Wu, Yaojiong Wu, Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing(2008) PLoS ONE. Apr 2;3(4):e1886). 하지만, 일반 골수나 제대혈 등과 같이 성체로부터 줄기세포를 얻는 수율은 지극히 낮으며, 계대 배양이 가능한 기간도 다른 세포주에 비해 짧아, 다량의 세포 배양 분비물을 얻는데 많은 어려움이 따른다.
- [7] 이에 대한 대안으로서, 무한대의 증식능과 분화능을 지닌 인간 배아줄기세포 유래의 혈관형성전구세포로부터 창상 치료제의 개발 가능성이 제시될 수 있을 것이다. 인간 배아줄기세포는 무한한 자가 재생 능력(self-renewality)과 특정 환경 내에서 인간의 몸을 구성하는 삼배엽성 세포(내배엽, 중배엽, 외배엽)로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotency)을 가진 세포로서(Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science (1998) 282:1145-1147), 혈관 세포, 신경 세포, 근육 세포, 췌장 세포 등으로 분화를 유도한 연구들이 발표됨에 따라 난치병 치료에 큰 가능성을 가진 세포로 여러 분야에서 중요한 세포로 인식 되어왔다. 그러나, 인간 배아줄기세포는 분화하는 동안, 조직학적으로 이들 내배엽, 중배엽, 외배엽으로부터 유래하는 조직이 혼합되어 일종의 종양인 기형종(teratoma)이 발생할 가능성이 있으며, 원하는 세포만을 분리하는 데는 고도의 기술이 필요하다. 따라서, 보다 안전하고, 대량생산이 가능하며, 비용면이 고려된 창상 치료제 개발이 절실히 요구된다.
- [8] 한편, 이러한 피부재생의 효능을 가진 배양 분비물 또는 이의 구성 인자들의 조합은 주름개선 또는 피부노화방지를 위한 새로운 화장품 이용을 가능하게 할 것이다.

**발명의 상세한 설명**  
**기술적 과제**

- [9] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 이용하면서도 기형종(teratoma)의 위험성없이 안전하면서도 피부재생 효과가 탁월한 치료적 조성물 및 치료방법을 제공하는 데 그 목적이 있다. 또한, 본 발명은 피부재생을 통해 주름개선 또는 피부노화방지용 화장품으로 사용될 수 있는 조성물을 제공하는 데 또 다른 목적이 있다.

### 기술적 해결방법

- [10] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명자들은 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 분비물 농축액을 이용한 창상 및 화상창상 치료제 개발을 위한 다양한 연구를 수행하였고, 그 결과, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 배양/증식하여 대량 배양 분비물을 얻고 이를 농축 후, 창상 및 화상 창상 동물 모델에 적용 시, 현재 창상치료에 널리 이용되어지고 있는 hGH(human growth hormone)에 비해 단시간에 보다 효과적으로 상처 부위 크기가 감소하는 것을 발견하였다. 또한, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액 처치군에서의 조직학 분석 결과, 배양액 처치군에 비해 많은 양의 콜라겐층이 형성되었으며, 이와 함께 재생피화가 보다 빠르게 촉진되었음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [11] 본 발명은 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부재생용 조성물을 제공한다.
- [12] 상기 배아줄기세포로는 인간 배아줄기세포를 이용하는 것을 포함한다.
- [13] 상기 배양 분비물, 또는 이의 분획물은 고농도로 농축되는 것이 바람직하고, 50배 이상으로 농축된 것을 이용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [14] 상기 조성물은 피부재생의 효과가 있어 창상치료, 화상창상치료 또는 피부성형의 치료적 용도로 이용되는 것이 바람직하다.
- [15] 또한, 상기 조성물은 피부재생을 통한 주름개선 또는 피부노화방지용 기능성 화장품에 이용될 수 있다.
- [16] 한편, 본 발명은 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF) 1,250-1,250,000 pg/ml, 섬유아세포 성장인자-2(Basic fibroblast growth factor, FGF-2) 35-35,000 pg/ml, 혈소판유래 성장인자-AA(Platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA) 650-650,000 pg/ml, 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF) 400-400,000 pg/ml 을 유효성분으로 포함하는 피부재생용 조성물을 제공한다. 또한, 상기 조성물은 피부재생을 통한 주름개선 또는 피부노화방지용 기능성 화장품에 이용될 수 있다.
- [17] 상기 조성물은 Flt-3리간드(Flt-3 Ligand) 4-4,000 pg/ml, 인터류킨-1 $\alpha$ (Interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) 2-2,000 pg/ml, 인터류킨-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 2-2,000 pg/ml, 인터류킨-17(Interleukin-17, IL-17) 0.2-200 pg/ml, 혈소판유래 성장인자-BB(PDGF-BB) 2-2,000 pg/ml, 란티스(Rantes, CCL5) 2-2,000 pg/ml 으로

- 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 성분을 더 포함할 수 있다.
- [18] 또한, 상기 조성물은 프락탈카인(Fractalkine) 160-160,000 pg/ml, 백혈구증식촉진인자(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 75-75,000 pg/ml, 인터류킨-6(Interleukin-6, IL-6) 400-400,000 pg/ml, 인터류킨-8(Interleukin-8, IL-8) 19,000-19,000,000 pg/ml, 인터류킨-9(Interleukin-9, IL-9) 34-34,000 pg/ml, 케모카인 IP-10(Chemokine IP-10) 45-45,000 pg/ml, 단핵구 화학유인물질 단백질-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 6-6,000 pg/ml 으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 성분을 더 포함할 수 있다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 피부재생용 조성물을 이용한 치료방법을 제공한다.
- [20] 이러한 치료방법은 (a) 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 배양하는 단계; (b) 혈관형성전구세포를 제거하여 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 준비하는 단계; (c) 상기 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 포유동물의 피부에 적용하는 단계를 포함하여 이루어진다.
- [21] 상기 치료방법은 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 50배 이상 농축하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [22] 상기 단계(a)에서 상기 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물의 효과적인 획득을 위해, 배양 접시에 콜라겐 코팅을 한 후 배양하는 것이 바람직하고, 배양액으로는 EGM-2 MV 배양액을 사용하여 배양하는 것이 바람직하나, 필요에 따라서는, DMEM 배양액, M199 배양액 또는 이들 혼합 배양액 등 공지의 배양액이 이용될 수 있고, 세포증식은 계대 배양으로 증식될 수 있으며, 계대 배양 단계별로 각각 필요한 배양액을 선별하여 배양할 수 있다.
- [23] 또한, 얻어진 배양 분비물의 고농도 농축을 위해서는, TFF membrane을 이용한 농축 시스템을 이용하여, 10KDa 이상의 물질들만을 농축하여 농축액을 만드는 것이 바람직하나, 필요에 따라서는, 3KDa, 5KDa 혹은 전체 물질의 농축액을 이용할 수도 있다.
- [24] 상기 단계(b)에서 배아 줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 적용하기 위해서는 창상 부위에 실리콘 링을 장착한 후 그 내부에 배아 줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 적용할 수 있다.
- [25] 상기 배아 줄기세포로는 인간 배아줄기세포가 이용될 수 있으며, 이들 인간 배아줄기세포는 무한증식성을 가지므로 계대 배양 등을 통하여 지속적으로 배양할 수 있으며, 동결건조 등 공지의 방법으로 유통이 가능한 조성물로 제공될 수 있다. 상기 농축액은 TFF 멤브레인(TFF membrane)을 이용하여 농축된 고농도의 농축액으로서 보존제, 안정화제 등을 첨가하여 유통이 가능한 상품으로 제공될 수 있다.

### 유리한 효과

- [26] 본 발명의 피부재생용 조성물 및 이를 이용한 창상 및 화상창상 치료 방법은

무한 자가증식 능력을 가진 인간 배아줄기세포를 세포 공급원으로 이용함으로써, 세포 공급 제한성의 문제를 크게 감소시킬 수 있을 뿐 아니라, 세포 자체의 이식이 아닌 배양 분비물만을 치료제로 이용함으로써 기형종 형성등의 위험성을 가지지 않는다. 한편, 본 발명의 피부재생용 조성물이 함유된 화장료 조성물은 주름을 개선하거나 피부노화를 방지하여 탄력있는 피부를 제공하는 효과가 있다.

- [27] 특히, 본 발명의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액의 적용 후의 경과를 보면, 인간성장호르몬(hGH) 등의 비교군에 비해 창상 부위 크기가 단 기간 내에 감소되며, 많이 콜라겐 층이 형성됨으로써 보다 효과적으로 재상피화가 촉진되는 것을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 치료 방법에 따르면 적용된 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액에 포함되어 있는 혈관 생성 촉진 및 상처 치유 인자들로 인해 동물 체내에 존재하는 상처 치유 인자(성장인자, 염증세포, 기질세포 및 피부전구세포 등)들의 창상 부위로의 이동을 보다 용이하게 함으로써 창상 치료를 보다 효과적으로 할 수 있다.

- [28] 따라서, 본 발명의 창상 치료 방법은 세포 공급의 제한이 없어 대량으로 배양 분비물을 획득할 수 있으며, 종래 인간성장 호르몬(hGH)를 이용한 창상 치료 방법보다 단시간 내에, 보다 높은 효율로 상처를 치유할 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 본 발명의 인간배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액의 multiplex cytokine array로써 인간배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액의 성분 및 유효 물질 함량을 분석한 표이다.
- [30] 도 2는 창상 치료 효과 검증을 위한 창상 동물 모델 제작 및 적용 과정을 나타낸 사진과 모식도이다.
- [31] 도 3a는 저농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물(1X), 고농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물농축액(50X), 고농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물농축액(50X)과 hGH, 그리고 hGH만을 처리한 창상 모델에서 14일간 실시된 상처 크기 치유 측정치이다.
- [32] 도 3b는 이들 동물 모델의 조직학적 분석 결과로서, 상처부위 조직을 채취하여 Masson's Trichrome 염색을 통해 콜라겐 합성을 확인한 결과이다.
- [33] 도 4는 화상치료 개선효과 검증을 위한 화상동물모델 제작 과정을 나타낸 사진과 모식도이다 개선효과 검증을 위해 각 군별 상처 크기 감소를 2주간 관찰한 결과이다.
- [34] 도 5a는 저농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물, 고농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물농축액(50X), 고농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물농축액(50X)과

hGH, hGH만을 처리한 화상 창상 모델에서 14일간 실시된 상처 크기 치유 측정치이다.

[35] 도 5b는 이들 동물 모델의 조직학적 분석 결과로서, 상처부위 조직을 채취하여 Masson's Trichrome 염색을 통해 콜라겐 합성을 확인한 결과이다.

[36] 도 6a는 UV 조사에 따른 인간 피부섬유아세포(HDF)의 세포 활성을 실험한 것으로, 대조군은 본 발명의 조성물을 투여하지 않은 사진결과이고, 실시예 2 및 실시예 3은 본 발명의 실시예에 따른 조성물을 투여한 사진결과이다.

[37] 도 6b는 도 6a의 대조군, 실시예 2 및 3에 따른 UV 조사 후 인간 피부섬유아세포(HDF)의 세포수를 표시한 것이다.

[38] 도 7은 본 발명의 실시예 2 및 3의 조성물을 투여한 것에 대한 웨스턴 블로팅 분석결과이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

[39] 본 명세서에서, "배아 줄기세포"는 포유동물 유래의 모든 배아 줄기세포를 포함하며, 인간 배아줄기세포를 포함한다.

[40] 상기 인간 배아줄기세포는 인간 상실배의 내부 세포 괴로부터 유래된 전능 세포를 포함한다. 상기 인간 배아줄기세포는 예를 들면, CHA-hES3 (Jumi Kim, Sung-Hwan Moon, Soo-Hong Lee, Dong-Ryul Lee, Gou-Young Koh, and Hyung-Min Chung, Effective Isolation and Culture of Endothelial Cells in Embryoid Body Differentiated from Human Embryonic Stem cells (2007) STEM CELLS AND DEVELOPMENT 16:269.280) 등이 사용될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 또한, 인간 배아줄기세포는 당업자에 의하여 용이하게 구축될 수 있다.

[41] 상기 배양 분비물 채취에 이용되는 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포는 저산소 상태에서 배상체 형성을 통해 분화를 유도한 후, CD133/KDR의 이중마커 이용한 유세포 분리(FACS)를 통해 고농도로 농축된 배아 줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 확립하여 배양하는 것이 바람직하다.

[42] 본 발명에 있어서 "인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액"은 인간 배아줄기세포에서 유래된 혈관형성전구세포로부터 얻어진 배양 분비물을 의미하고, 이를 농축한 고농도 농축액을 포함한다.

[43] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[44]

[45] 실시예 1.

[46] **(1) 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물의 획득 및 농축**

[47] 상기 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 콜라겐이 코팅된 배양 접시 위에서 EGM-2/MV(Cambrex) 배양액 중에서 배양하고, 세포의 농도가 약 70-80% 정도로 배양 접시에 분포되었을 때 48시간의 배양을 통해 인간 배아줄기세포



유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 얻었다. 얻어진 배양 분비물은 TFF membrane 농축 시스템을 이용하여 50배로 농축하여 고농도의 배양 분비물 농축액을 얻었다.

[48]

[49] **(2) 창상 및 화상 창상 동물 모델 제작**

[50] 도 2는 창상 치료 효과 검증을 위한 창상 동물 모델 제작 및 적용 과정을 나타낸 사진과 모식도이다.

[51] 창상 치료 효과 검증을 위한 상기 창상 동물 모델 제작은 6주령의 누드마우스 등쪽에 바이옵시 펀치(biopsy punch)를 이용하여 12mm 피부 전층박리상처를 유도하였으며, 적용 시 배양 분비물 농축액의 지속적인 창상 부위 노출을 위해 창상 부위에 실리콘 링을 장착한 후 동물 모델을 제작 하였다.

[52] 도 4는 화상치료 개선효과 검증을 위한 화상동물모델 제작 과정을 나타낸 사진과 모식도이다 개선효과 검증을 위해 각 군별 상처 크기 감소를 2주간 관찰한 결과이다.

[53] 화상 치료 효과 검증을 위한 상기 화상 창상 동물 모델 제작은 6주령 CF-1 마우스 등쪽에 아이언 스탬프 (Iron stamp)를 가볍게 얹어 놓는 방법으로 70 °C 에서 10초 동안 5mm 피부 전층 화상을 유도하였다. 화상을 입힌 후 tissue water로 부터 남아 있는 열기를 제거하기 위해 아이스 팩을 이용하여 약 5분간 화상부위를 쿨링하여 동물 모델을 제작 하였다.

[54]

[55] **(3) 창상 및 화상창상 동물 모델로의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액 적용**

[56] 상기 얻어진 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 제작된 창상 동물 모델에 적용하였다. 적용 시, 200 $\mu$ l의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 창상 동물 모델의 실리콘링 내부에 적용하였다.

[57] 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액의 효력 검증을 위해 동일한 창상 동물 모델에 비교군으로 배양액(EGM-2 MV medium), 저농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관 전구세포 배양 분비물, 인간 성장 호르몬(hGH)를 적용한 후, 2주간 상처 크기의 감소 정도를 관찰하였다.

[58] 또한, 2주후 조직학 분석을 통해 상처 치유에 중요한 인자인 콜라겐의 합성과 재상피화 과정을 관찰하였다.

[59] 콜라겐 합성의 확인은 Masson's Trichrome염색을 실시하였다.

[60]

[61] **실험예 1.**

[62] 실시예 1의 (1)에서 명시된 조건하에서 배양되어 얻어진 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 multiplex cytokine array를 이용하여 얻어진 고농도의 농축액(50배)내 유효 성분을 분석하였다.

- [63] 도 1은 본 발명의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액의 성분 및 유효 물질 함량을 분석한 표이다.
- [64] 도 1에 표시된 바와 같이 50배 농축한 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액내에는 EGF, FGF-2, Fractalkine, GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1, PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF 등의 혈관 신생 및 상처 치유 촉진 유효 성분들인 다량 함유 되어있는 것을 알 수 있다.
- [65] 상기 결과는 본 발명에 사용된 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액이 창상 및 화상창상 치료에 용이한 혈관 신생 및 상처 치유 촉진 유효 성분을 다량 포함하고 있음을 나타낸다.
- [66]
- [67] **실험예 2.**
- [68] 실시예 1의 (2)에서 명시된 방법으로 창상 동물 모델을 제작한 후, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액과 다른 비교군들을 창상 동물 모델 등쪽의 실리콘링 내부로 적용하였다(도2 참조).
- [69]
- [70] **실험예 3.**
- [71] 실시예 1의 (3)에서 명시한 바와 같이 배양액(EGM-2 MV medium, 대조군), 저농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관 전구세포 배양 분비물(저농도), 고농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액(고농도, 50배), 인간 성장 호르몬(hGH)를 각각 적용한 뒤 각 처치군을 2주간 관찰하여 상처 크기의 감소 정도를 관찰 하였다(도3a 참조). 도 3a에 보이는 바와 같이 배양액 처치군(Medium)의 경우 상처 크기 감소가 가장 늦게 이루어졌으며, 저농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 처치군(저농도)과 인간 성장 호르몬(hGH)의 경우 대조군의 배양액 처치군 보다는 다소 빠른 상처 크기의 감소를 관찰할 수 있었으나, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액 처치군(고농도)과 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액과 인간 성장 호르몬(hGH)의 복합처치군(고농도+hGH)의 경우가 타 처치군에 비해 현저히 빠른 속도로 상처 크기가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.
- [72] 상기 결과는 본 발명에 사용된 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 이용한 창상 치료 효과가 다른 처치군에 비해 월등히 효율적임을 나타낸다.
- [73]
- [74] **실험예 4.**
- [75] 실시예 1의 (3)에서 명시한 바와 같이 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 제작된 창상 동물 모델에 적용한 뒤, 2주후 상처부위의 샘플을 채취하여 조직학 분석을 실시하였다.
- [76] 도3b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 치료법에 따라 처치된 인간

배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액(고농도) 적용군의 경우, 비교군인 배양액 처치군에 비해 월등히 높은 콜라겐의 합성이 확인되었으며, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액과 인간 성장 호르몬(hGH)의 복합처리군(고농도+hGH)에서도 이와 유사하게 월등히 높은 콜라겐 합성이 확인되었다.

[77] 상기 결과는 본 발명에 사용된 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액을 이용한 창상 치료 효과가 상처 치유에 필수적인 콜라겐의 다량 합성으로 이것이 재생피화를 위한 가교역할을 수행하여 재생피화를 빠르게 촉진했음을 나타낸다. 상기 다량의 콜라겐 합성은 본 발명의 피부재생용 조성물이 주름개선 또는 피부노화방지용 화장품으로 이용될 수 있음을 나타낸다.

[78]

[79] 실험예 5.

[80] 실시예 1의 (2)에서 명시된 방법으로 화상 창상 동물 모델을 제작한 후, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액과 다른 비교군들을 화상 창상 동물 모델 등쪽 화상 창상 부위에 적용하였다(도4 참조).

[81]

[82] 실험예 6.

[83] 실시예 1의 (3)에서 명시한 바와 같이 배양액(EGM-2 MV medium, 대조군), 저농도의 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물(저농도), 고농도의 인간배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액(고농도, 50배), 인간 성장 호르몬(hGH)를 각각 적용한 뒤 각 처치군을 2주간 관찰하여 상처 크기의 감소 정도를 관찰 하였다(도 5a 참조). 도 5a에서 보이는 바와 같이 대조군의 경우 상처 크기 감소가 가장 늦게 이루어졌으며, 저농도와 고농도, 다른 비교군인 인간 성장 호르몬(hGH)의 경우 대조군 보다는 다소 빠른 상처 크기의 감소를 관찰할 수 있었다. 고농도+hGH의 경우 대조군과 다른 비교군에 비해 현저히 빠른 속도로 상처 크기가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다.

[84] 상기 결과는 본 발명에 사용된 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 분비물을 이용한 화상 치료개선 효과가 대조군에 비해 월등히 효율적임을 나타낸다.

[85]

[86] 실험예 7.

[87] 실시예 1의 (3)에서 명시한 바와 같이 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 제작된 창상 동물 모델에 적용한 뒤, 2주 후 상처부위의 샘플을 채취하여 조직학 분석을 실시하였다.

[88] 도 5b에서 확인 할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 치료법에 따라 도포된 인간배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 분비물 처치군의 경우, 대조군에 비해 월등히 높은 콜라겐의 합성이 확인되었다.

[89] 상기 결과는 본 발명에 사용된 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 이용한 화상 치료 개선 효과가 화상 치유에 필수적인 콜라겐의 다량 합성으로 이것이 재생피화를 위한 가교역할을 수행하여 재생피화를 빠르게 촉진했음을 나타낸다. 상기 다량의 콜라겐 합성은 본 발명의 피부재생용 조성물이 주름개선 또는 피부노화방지용 화장품으로 이용될 수 있음을 나타낸다.

[90]

[91] 실시예 2.

[92] 실시예 1의 성분 중 하기 표 1에 도시된 농도의 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 섬유아세포 성장인자-2(Basic fibroblast growth factor, FGF-2), 혈소판유래 성장인자-AA(Platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA), 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)를 혼합하여 주름개선 또는 피부노화방지용 조성물을 제조하였다.

[93] 표 1

성분명	농도(pg/ml)
EGF	11245
FGF-2	395
PDGF-AA	5745
VEGF	4185

[94]

[95] 실시예 3.

[96] 실시예 1의 성분 중 하기 표 2에 도시된 농도의 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF), 섬유아세포 성장인자-2(Basic fibroblast growth factor, FGF-2), 혈소판유래 성장인자-AA(Platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA), 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), Flt-3 리간드(Flt-3 Ligand), 인터류킨-1 $\alpha$ (Interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ), 인터류킨-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), 인터류킨-17(Interleukin-17, IL-17), 혈소판유래 성장인자-BB(PDGF-BB), 란티스(Rantes, CCL5)를 혼합하여 주름개선 또는 피부노화방지용 조성물을 제조하였다.

[97] 표 2

성분명	농도(pg/ml)
EGF	11245
FGF-2	395
PDGF-AA	5745
VEGF	4185
Flt-3 Ligand	40
IL-1 $\alpha$	23
IL-1 $\beta$	22
IL-17	3
PDGF-BB	20
RANTES	21

[98]

[99] 실험예 8. 인간의 피부섬유아세포의 세포 활성 실험 (주름활성 평가)

[100] 인간의 피부섬유아세포(Human Dermal Fibroblast, HDF)를 10% 우태혈청과 100 U/ml 페니실린, 100  $\mu\text{g/ml}$  스트렙토마이신이 보충된 DMEM(Invitrogen-Gibco-BRL, Grand Island, NY) 배지에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

[101] 상기 배양된 HDF 세포를 웰 플레이트에, 웰 당 5D10<sup>4</sup> 개의 세포를 배지를 이용하여 접종하고, 실시예 2 및 3에서 제조된 조성물을 24 시간 동안 전 처리한 후, 인산완충용액으로 세척하였다. 그 후 UV 조사기를 이용하여 UV 조사(UVA: 10 J/cm<sup>2</sup>) 후 배지를 넣고 72 시간 동안 배양하였다. CCK-8 kit (Dojindo, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 37°C에서 2 시간 반응시키고, 이를 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포의 성장 여부를 사진으로 찍어 비교 하였다.

[102] 도 6a에서 대조군은 본 발명의 조성물을 처리하지 않은 사진이고, 실시예 2 및 실시예 3은 본 발명의 실시예에 따른 조성물을 처리한 사진이다.

[103] 도 6b는 UV 조사 후 인간 피부섬유아세포(HDF)의 세포수를 표시한 것이다.

[104] 도 6a 및 6b에 보이는 바와 같이, 실시예 2에 따라 제조된 단백질 조성물은 대조군과 비교해 UV에 의해 손상된 HDF 세포가 유의적으로 활성화되는 것을 확인할 수 있었고, 실시예 3의 경우에는 현저하게 활성화되는 것을 확인하였다.

[105]

[106] 실험예 9. 콜라겐의 발현 확인 (웨스턴 블로팅 분석)

[107] 배양된 HDF 세포를 웰 플레이트에 2D10<sup>5</sup> 개씩 접종한 후, 실시예 2 및 3에서 제조된 조성물을 24 시간 동안 전 처리 후 인산완충용액으로 세척하였다. 그 후 UV 조사기를 이용하여 UV 조사(UVA: 10 J/cm<sup>2</sup>) 후 배지 DMEM을 넣고 72 시간

동안 배양하였다. 그 72 시간 후에 인산완충용액으로 세척한 후 세포를 RIPA 완충용액(50 mM 트리스-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100, 1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM 디티오쓰레이톨, 1 µg/ml 류팍틴 및 20 µg/ml PMSF, pH 7.4)을 이용하여 분해하여 단백질을 얻었다. 20 mg의 단백질을 8% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 이용하여 분리하였다. 단백질이 분리된 겔을 PVDF막에 전이시킨 후, PVDF막을 항-콜라겐 항체(희석비, 1:250)와 반응시킨 후, 호스래디쉬 퍼옥시다아제-컨쥬게이트드 항-고우트 IgG 항체(horseradish peroxidase-conjugated anti-goat IgG antibody)(희석비, 1:10,000)로 다시 반응시켰다. 얻어진 밴드를 이뮤노바이론 웨스턴 시약(immunobilon western reagent)으로 X-선 필름에 노출시켜 분석하였다.

- [108] 도 7은 본 발명의 실시예 2 및 3의 조성물을 처리한 것에 대한 웨스턴 블로팅 분석결과이다. 도 7로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 조성물을 처리하지 않은 대조군의 경우 UV 조사 후 콜라겐의 발현이 나타나지 않았으나, 실시예 2의 조성물을 처리한 경우 콜라겐이 발현되었고, 실시예 3의 조성물을 처리한 경우 콜라겐의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

#### 산업상 이용가능성

- [109] 본 발명은 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포(embryonic stem cell derived endothelial progenitor cells) 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 포함하는 피부재생용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 인간 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포의 배양액에서 분리된 생물학적 단백질을 창상, 화상창상에 적용하거나, 피부성형에 적용시켜 피부재생을 통하여 치료하는 한편, 주름개선 또는 피부노화방지용 기능성 화장품으로 이용하는 기술에 관한 것이다.

## 청구범위

- [1] 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 하는 피부재생용 조성물.
- [2] 제1항에 있어서, 상기 배아줄기세포는 인간 배아줄기세포인 피부재생용 조성물.
- [3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 배양 분비물, 또는 이의 분획물은 50배 이상 농축된 것을 특징으로 하는 피부재생용 조성물.
- [4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 창상치료, 화상창상치료 또는 피부성형에 이용되는 것인 피부재생용 조성물.
- [5] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 주름개선 또는 피부노화방지용 화장료에 이용되는 것인 조성물.
- [6] 상피세포성장인자(Epidermal Growth Factor, EGF) 1,250-1,250,000 pg/ml, 섬유아세포 성장인자-2(Basic fibroblast growth factor, FGF-2) 35-35,000 pg/ml, 혈소판유래 성장인자-AA(Platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA) 650-650,000 pg/ml, 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF) 400-400,000 pg/ml 을 유효성분으로 포함하는 피부재생용 조성물.
- [7] 제6항에 있어서, Flt-3 리간드(Flt-3 Ligand) 4-4,000 pg/ml, 인터류킨-1 $\alpha$ (Interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ) 2-2,000 pg/ml, 인터류킨-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 2-2,000 pg/ml, 인터류킨-17(Interleukin-17, IL-17) 0.2-200 pg/ml, 혈소판유래 성장인자-BB(PDGF-BB) 2-2,000 pg/ml, 란티스(Rantes, CCL5) 2-2,000 pg/ml 으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 성분을 더 포함하는 피부재생용 조성물.
- [8] 제6항 또는 제7항에 있어서, 프락탈카인(Fractalkine) 160-160,000 pg/ml, 백혈구증식촉진인자(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 75-75,000 pg/ml, 인터류킨-6(Interleukin-6, IL-6) 400-400,000 pg/ml, 인터류킨-8(Interleukin-8, IL-8) 19,000-19,000,000 pg/ml, 인터류킨-9(Interleukin-9, IL-9) 34-34,000 pg/ml, 케모카인 IP-10(Chemokine IP-10) 45-45,000 pg/ml, 단핵구 화학유인물질 단백질-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 6-6,000 pg/ml 으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 성분을 더 포함하는 피부재생용 조성물.
- [9] 제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 조성물은 창상치료, 화상창상치료 또는 피부성형에 이용되는 것인 피부재생용 조성물.
- [10] 제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 조성물은 주름개선 또는 피부노화방지용 화장료에 이용되는 것인 조성물.
- [11] (a) 배아줄기세포 유래 혈관형성전구세포를 배양하는 단계;

- (b) 혈관형성전구세포를 제거하여 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 준비하는 단계;
- (c) 상기 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 포유동물의 피부에 적용하는 단계를 포함하는 창상치료, 화상창상치료 또는 피부성형하는 방법.
- [12] 제11항에 있어서, 배양 분비물, 또는 이의 분획물을 50배 이상 농축하는 단계를 더 포함하는 창상치료, 화상창상치료 또는 피부성형하는 방법.
- [13] 제12항에 있어서, 상기 농축단계는 TFF 멤브레인(TFF membrane)을 이용한 농축 시스템을 이용하여, 10KDa 이상의 물질들만을 농축하는 것을 특징으로 하는 창상치료, 화상창상치료 또는 피부성형하는 방법.



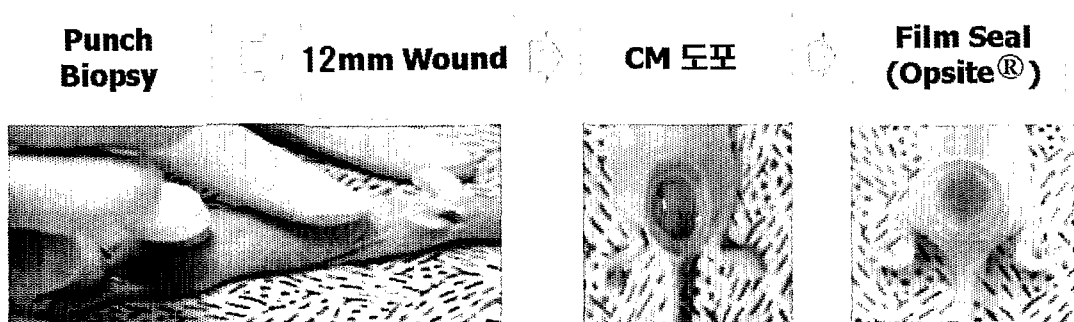
[Fig. 1]

< 혈관형성전구세포 배양 분비물 농축액의 유효 성분 분석표 >

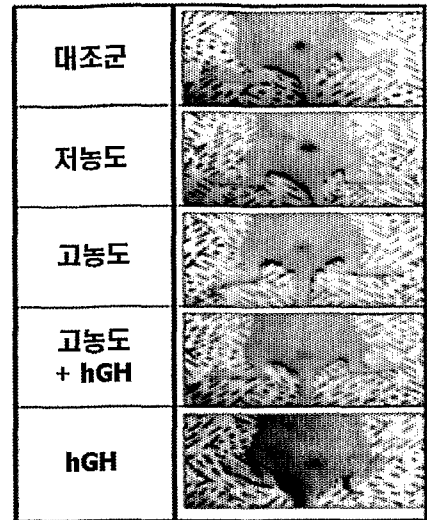
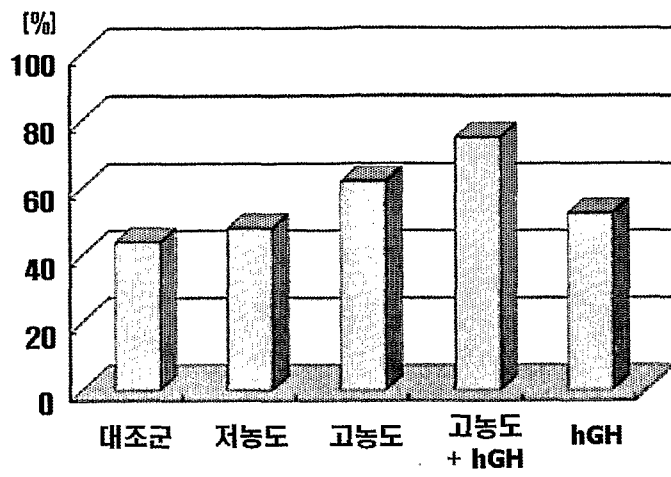
Analyte Name	혈관형성전구세포 배양 분비물 (pg/ml)
EGF	12584
FGF-2	383
Flt-3 Ligand	48
Fractalkine	1605
GM-CSF	755
IL-1 $\alpha$	26
IL-1 $\beta$	21
IL-6	4332
IL-8	239030
IL-9	345
IL-17	3
IP-10	458
MCP-1	63
PDGF-AA	6667
PDGF-BB	17
RANTES	24
VEGF	4265

[Fig. 2]

장상 동물 모델 제작 과정



[Fig. 3a]

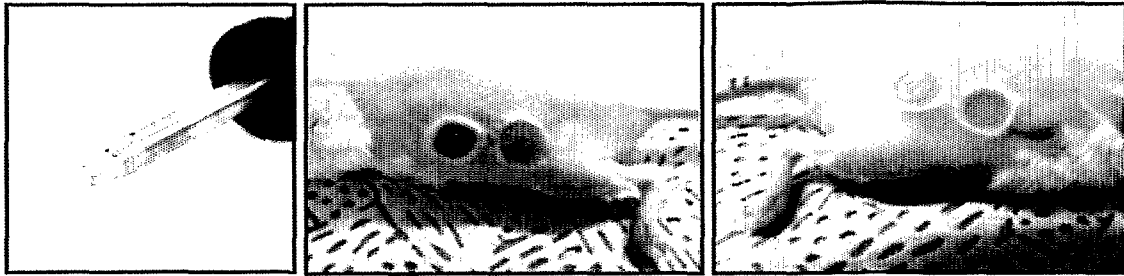


[Fig. 3b]

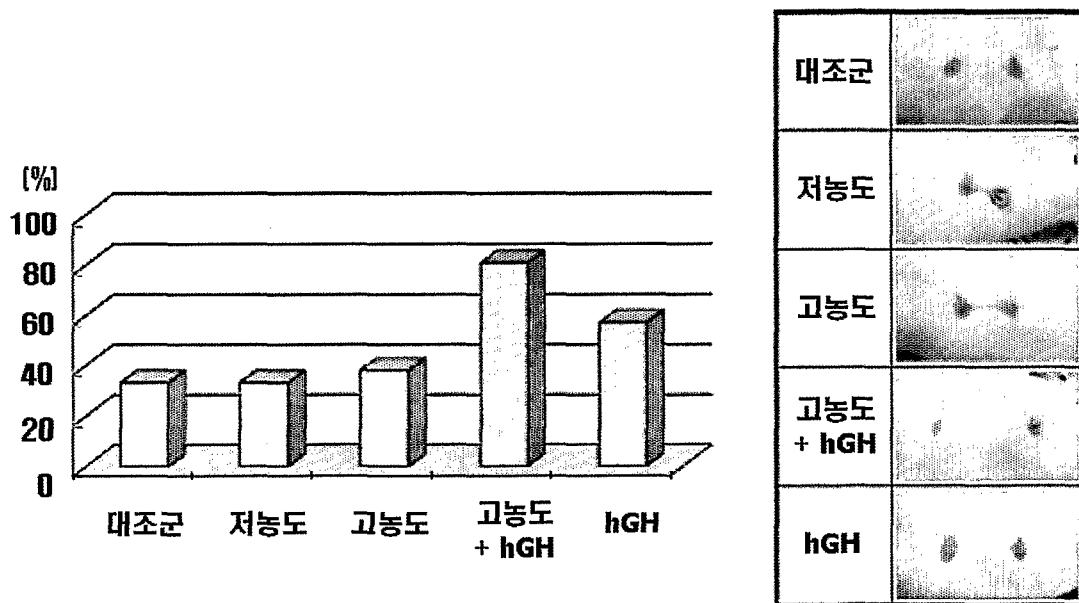


[Fig. 4]

**화상 창상 동물 모델 제작 과정**



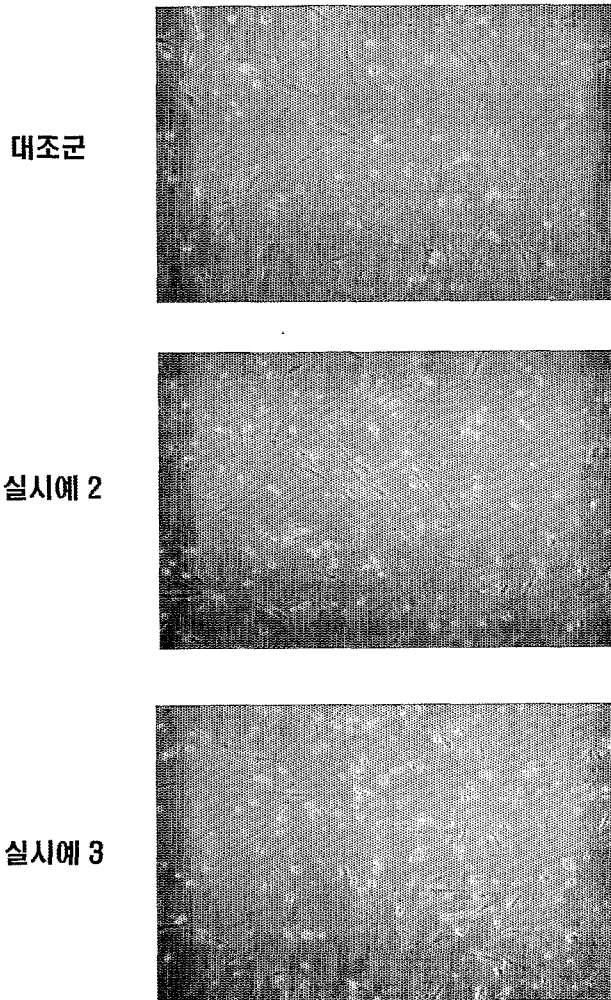
[Fig. 5a]



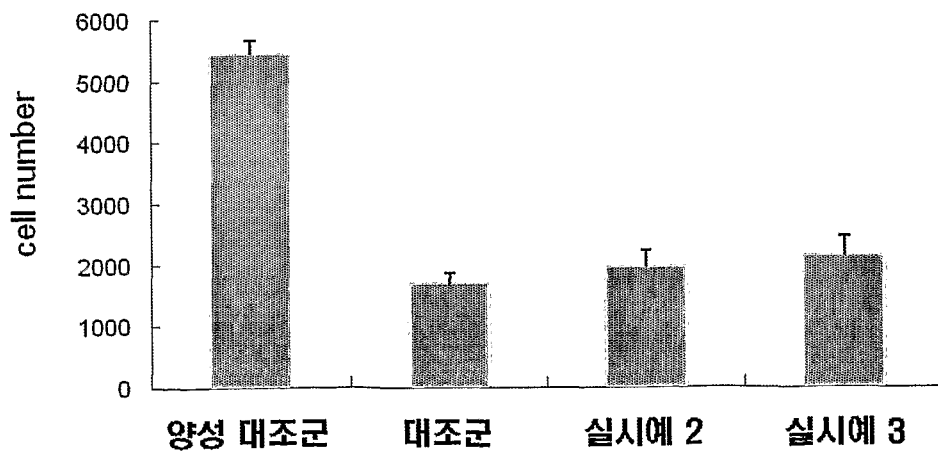
[Fig. 5b]



[Fig. 6a]



[Fig. 6b]



[Fig. 7]

양성 대조군

대조군

실시에 2

실시에 3



콜라겐 타입 I