

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 2일 (02.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/137878 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/04 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003341
- (22) 국제출원일: 2010년 5월 26일 (26.05.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0045954 2009년 5월 26일 (26.05.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **주식회사 운화 (UNHWA CORPORATION)** [KR/KR]; 전라북도 전주시 덕진구 호성동 1가 868-5, 561-211 Jeollabuk-do (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **홍남주 (HONG, Nam Ju)** [KR/KR]; 전라남도 강진군 작천면 현산리 죽현 690 번지, 527-821 Jeollanam-do (KR). **진영우 (JIN, Young Woo)** [KR/KR]; 전라북도 전주시 덕진구 호성동 2가 진흥 W 파크 3단지 311동 1205호, 561-808 Jeollabuk-do (KR). **이은경 (LEE, Eun Kyong)** [KR/KR]; 전라북도 익산시 신동 820-45 번지, 570-976 Jeollabuk-do (KR). **홍선미 (HONG, Sun Mi)** [KR/KR]; 전라북도 전주시 덕진구 인후 1가 아중마을 부영아파트 503동 904호, 561-231 Jeollabuk-do (KR).

(74) 대리인: **이치영 (LEE, Cheo Young)**; 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 역삼빌딩 11층 5T 국제특허법률사무소, 135-080 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

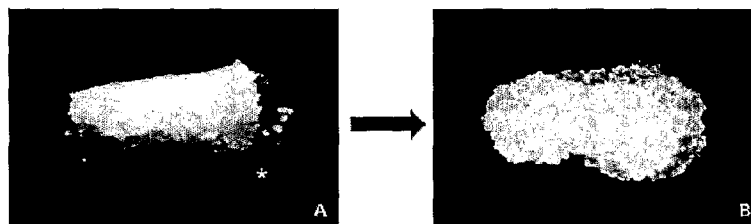
공개:

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

(54) Title: PLANT STEM CELL DERIVED FROM CAMBIUM OF FAMILY *GINGKOACEAE* AND METHOD FOR THE ISOLATION THEREOF

(54) 발명의 명칭: 은행나무과의 형성층 유래 식물줄기세포 및 이의 분리방법

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a stem cell derived from cambium of family *Gingkoaceae* and to method for the isolated culturing thereof. The stem cell derived from cambium of family *Gingkoaceae* according to the present invention is advantageous as it is isolated at a non-differentiated state without passing through a dedifferentiation process and stably maintained without causing a variation in the cellular growth rate and growth pattern even during a long-term culture, thereby enabling a mass culture. In addition, the stem cell derived from cambium of family *Gingkoaceae* according to the present invention showed an antioxidant effect similar to or higher than that of existing synthetic antioxidants when the radical-scavenging activity for scavenging radicals generated by the treatment of an oxidant is measured, and thus can be valuably used as an excellent anti-inflammatory composition.

(57) 요약서: 본 발명은 은행나무과 (family *Gingkoaceae*)의 형성층 유래 줄기세포 및 그 분리방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포는 탈분화과정없이 미분화상태로 분리되어 장기 배양시에도 세포생장과 생장패턴에 변이 없이 안정적으로 유지되어 대량 배양이 가능하여 유용하다. 아울러, 본 발명에 따른 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포는 산화제 처리에 의하여 발생하는 라디칼 소거능을 측정할 결과, 기존의 합성 항산화제와 유사하거나 더 높은 항산화효과를 가지는 것으로 나타남바, 우수한 항산화용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2010/137878 A2

명세서

발명의 명칭: 은행나무과의 형성층 유래 식물줄기세포 및 이의 분리방법

기술분야

- [1] 본 발명은 은행나무과 (family *Gingkoaceae*)의 형성층 유래 줄기세포 및 그 분리방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 식물은 과거 식량 자원의 의미였으나, 현재에는 약제, 향료, 색소, 농약, 염료 등을 포함한 광범위한 화학물질의 공급원으로서 그 의미가 확대되고 있다. 특히, 식물 유래 유용 물질의 대부분은 항바이러스, 항박테리아, 항암, 항산화 능력 등의 생리 활성이 있어, 신의약품으로서 발전 가능한 이상적인 자원으로 주목 받고 있으며, 많은 식물 유래 물질들의 화학 구조와 활성 사이의 관계를 규명하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다.
- [4] 그러나, 생리 활성 물질은 의약품으로 개발하기 어려운 실정이며, 그 주된 이유는 다음과 같다. 첫째, 식물 내 생리 활성 물질의 함량이 극히 제한적이다. 둘째, 식물의 성장 속도는 매우 느리다. 셋째, 식물 유래 생리 활성 물질은 식물의 특정 기관 내에만 소량 존재한다. 넷째, 자연 훼손이라는 환경 문제가 연루되어 있다. 다섯째, 식물 유래 생리 활성 물질의 경우 화학적인 구조가 매우 복잡하여, 다단계 중합 과정이 요구되어 생산 비용이 매우 높은 경제적인 문제가 있다. 따라서, 식물 유래 생리활성 물질들을 상업적으로 안정적으로 공급하기 매우 어려웠다.
- [5] 그런데, 생물공학기법의 하나인 식물 세포 배양 방법은 환경문제를 유발시키지 않으면서도 식물 유래 유용물질을 안정적으로 공급할 수 있는, 가장 이상적인 기술로 오랫동안 평가 받고 있다. 대한민국 공개특허 1995-0000870 (1995. 01. 03)에 따르면 식물 세포 배양에 의한 유용물질의 생산은 식물에서 직접적인 추출에 의한 방법보다 수많은 장점이 있다. 특히, 기존의 추출법과는 달리, 외부 환경의 영향을 받지 않고도 지속적인 생산이 가능하여, 생태계 파괴와 같은 현안 문제들을 해결할 수 있는 최적의 방법으로 여겨지고 있다. 그러나, 식물 세포 배양에 대한 많은 관심과 노력에도, 산업화에 성공한 예는 아직까지 극히 일부에 불과한 실정이다. 이는 다수의 식물 세포 배양에서 세포 증식과 생산성의 변이가 주요 문제로 여전히 남아있기 때문이다.
- [6] 식물 발현 시스템에 식물 세포를 이용하는 경우, 식물 세포의 분화 조직, 예컨대 잎, 줄기, 종자 등은 분열능이 상실된 영구 조직이므로, 분열능을 가진 세포주로 전환시키기 위해 탈분화 과정이 필수적으로 선행되고 있다. 상기 탈분화 과정은 식물체의 한 조직이나 기관을 이용하여 배양하였을 때 그 조직이나 세포가 이미

특정 기능을 수행하도록 분화된 상태를 해체하는 것을 의미한다. 그러나, 이러한 탈분화 과정 중에 염색체 변이에 의해 세포주의 심각한 변이가 발생할 수 있다.

- [7] 특히, 식물 세포 배양을 통한 유용물질의 생산은 장기간의 배양기간 동안 빠른 세포 증식과 높은 대사물질 생산능이 안정적으로 유지되어야만 산업화가 가능하지만, 대부분의 세포주는 계대 배양에 의해 본래와는 다른 수많은 변이를 접하게 된다. 따라서, 이와 같은 변이 문제점을 극복하여, 식물 세포 배양을 통한 유용물질 생산에서 유전적으로 안정한 세포주를 획득하기 위한 방안이 절실한 실정이었다.

- [8] 이에 본 발명자 중 일부는 식물의 줄기에서 채취한 형성층만을 이용하여 캘러스를 유도한 방법을 개발한 바 있으나 (대한민국 등록특허 제0533120호), 이 등록특허는 단순히 목본 식물의 줄기 형성층을 이용하여 캘러스를 유도하였을 뿐이었다. 캘러스(callus)란 탈분화가 일어나 형성된 조직인 바, 이에 상기 등록특허는 여전히 탈분화에 의한 변이 문제를 보유하고 있는 문제점이 있었다. 또한, 본 발명자 중 일부는 탈분화에 의한 변이의 문제를 해결하고 안정적으로 증식이 가능한 유전적 안정성이 높은 세포주의 제공방법으로서 국제특허출원 PCT/KR2006/001544호의 발명을 개발한 바 있다. 그러나, 낙엽교목에 속하는 은행나무는 유용식물로 널리 알려진 것으로서, 이로부터 탈분화에 의한 변이의 문제를 해결하고 안정적으로 증식이 가능한 유전적 안정성이 높은 세포주를 획득하는 것이 여전히 요청되었다.

- [9] 이에 본 발명자는 은행나무과 식물의 형성층 유래 줄기세포를 분리함으로써 유용한 식물세포주를 제공하고자 예의노력한 결과, 은행나무과 식물의 형성층 유래 줄기세포를 분리하고, 상기 줄기세포가 안정적으로 증식되고, 배양 시 변이가 없음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[10]

[11] 발명의 요약

- [12] 본 발명의 목적은 탈분화 과정 없이 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포 및 그 분리방법을 제공하는 데 있다.

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 은행나무과 (family *Ginkgoaceae*)의 형성층에서 유래되고, 탈분화를 거치지 않은 선천적 미분화세포인 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포를 제공한다.

- [14] 본 발명은 또한, 다음의 단계를 포함하는 은행나무과 (family *Ginkgoaceae*)의 형성층 유래 줄기세포의 분리방법을 제공한다:

- [15] (a) 은행나무과 식물로부터 형성층 함유 조직을 수득하는 단계;
 [16] (b) 상기 수득된 형성층 함유 조직을 배지에서 배양하는 단계; 및
 [17] (c) 상기 형성층으로부터 세포들을 분리함으로써 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 단계.

- [18] 본 발명은 또한, 상기 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 함유하는 항산화용 조성물을

제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 함유하는 항산화용 기능성 식품을 제공한다.

[20] 본 발명의 다른 특징 및 구현에는 다음의 상세한 설명 및 첨부한 특허청구범위로부터 더욱 명백해 질 것이다.

[21]

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 재료식물(은행나무)의 횡단면에서 형성층을 관찰한 사진이다.

[23] 도 2는 본 발명에 따른 줄기세포의 유도 및 분리 사진으로, 2A는 줄기세포(화살표)와 사부(phloem) 세포(별표)의 극히 다른 형태를 보이는 사진이고, 2B는 줄기세포를 분리한 후 배양 3주 후의 사진이다.

[24] 도 3은 본 발명에 따른 줄기세포 (A) 및 은행나무의 수피 절편체 유도 캘러스(B)의 고체 배양 시 사진이다.

[25] 도 4는 본 배양과정의 줄기세포 (A) 및 은행나무의 수피 조직에서 유도한 캘러스(B)의 세포응집정도를 관찰한 현미경 사진이다 (×100).

[26] 도 5는 본 발명에 따른 줄기세포 (B) 및 은행나무 체세포(B)의 현미경 사진으로 좌측하단의 스케일 바는 25 μ m이다.

[27] 도 6은 Neutral red를 이용하여 액포를 염색 후 관찰한 본 발명에 따른 줄기세포(A) 및 은행나무 수피 조직에서 유도한 캘러스(B)의 현미경 사진으로, 우측하단의 스케일 바는 25 μ m이다.

[28] 도 7은 본 발명에 따른 줄기세포(A) 및 은행나무 수피 조직에서 유도한 캘러스(B)의 미토콘드리아를 관찰한 사진이다.

[29] 도 8은 본 발명에 따른 줄기세포의 생물반응기에서의 세포 성장곡선을 나타내는 그래프이다.

[30] 도 9는 본 발명에 따른 줄기세포(Stem cell) 및 은행나무 수피 조직에서 유도한 캘러스 (callus)의 성장속도 비를 나타낸 그래프이다.

[31] 도 10은 3L 공기부양식 생물반응기(A), 20L 공기부양식 생물반응기(B) 및 250L 공기부양식 생물반응기(C)에서 10일간 배양한 결과를 나타내는 사진이다.

[32] 도 11은 본 발명에 따른 줄기세포(Stem cell) 및 은행나무 수피 조직에서 유도한 캘러스(callus)의 동결보존 후 세포생존율을 나타낸 그래프이다.

[33] 도 12는 본 발명에 따른 줄기세포 추출물(GG-E) 및 엘리시터를 처리하여 배양한 배양물의 추출물(GP-E)의 농도별 라디칼 소거능을 보여주는 그래프이다.

[34]

[35] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에

[36] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로

이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[37] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[38] 본원에서, 유관속 “형성층”은 식물의 유관속 조직(vascular tissue) 내에 위치하는 측재분열조직으로 줄기와 뿌리에 위치한다. 형성층의 활동에 의해 식물의 비대생장이 일어나며, 그 결과 11,000년 이상의 연륜을 가진 거대 식물체가 존재할 수 있게 된다. 발생학적으로 유관속 형성층은 전형성층으로부터 기원되므로 분열조직적 연속성을 유지하면서 점진적으로 분화된 동일 분열조직으로 편의상 구분될 뿐으로 (식물형태학, 이재두 외 7인 공저, 아카데미 서적, 제10장, 1993), 본 발명에 있어서 형성층은 전형성층을 포함하는 것으로 해석된다. 이러한 형성층과 전형성층은 동일한 1기 분열조직으로서, 본 발명에 있어서 형성층 및 전형성층 조직을 사용하여 동일한 효과를 얻을 것임은 자명한 사항이다.

[39] 본원에서 식물 “줄기세포” (stem cell)란, 탈분화 과정을 거치지 않아 유전적으로 보다 안정한 선천적인 미분화세포를 말한다.

[40] 본원에서 “파쇄물”이란 세포를 detergent 등을 이용한 화학적 방법 또는 물리적 방법 등으로 파쇄하여 얻은 세포 용해물을 의미하며, 세포주의 “추출물”이란 세포를 용매에 녹여 분리한 물질로, 증류 또는 증발을 이용하여 농축될 수 있다. 또한, 세포주 “배양액”이란 세포를 배양시킨 다음, 세포를 제외하고 남은 세포 배양용액을 의미한다. 추가적으로 본원에서 “배양물”이란 배양액 및/또는 배양된 세포주를 포함하는 물질로서, 이때 배양된 세포주는 배양조건에 의하여 분화되거나 유용물질의 생산능 및/또는 분비능이 향상된 세포주를 모두 포함하는 개념이다.

[41] 본원에서 “선천적인 미분화 상태(innately undifferentiated)”란 탈분화 과정을 거쳐 미분화 상태로 존재하는 것이 아닌, 본래부터 분화 전 상태를 유지하는 것을 말한다.

[42] 본원에서 “캘러스”란, 탈분화 과정을 통하여 분화하지 않은 상태로 된 세포 또는 세포덩어리 (PNAS, 99(25): 15843, 2002)를 말한다.

[43] 본 발명은 일 관점에서, 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포에 관한 것으로, 이는 은행나무과의 형성층에서 유래되고, 탈분화를 거치지 않은 선천적 미분화세포이다.

[44] 이미 분화된 조직인 잎이나 줄기, 뿌리 부분을 사용할 경우, 캘러스를 형성하기 위해서는 분화된 조직에서 미분화조직으로 되돌아가는(rejuvenilation) 탈분화(dedifferentiation) 과정을 거쳐야 하는데 이 탈분화 과정 중에 체세포에 돌연변이가 나타나 세포 불안정성의 원인이 된다. 이에 본 발명자들은 체세포 변이가 거의 없는 식물 세포 시스템을 연구하던 중, 분열조직인 형성층에서만 특이적으로 세포주를 유도할 경우 탈분화를 거치지 않고 분열조직 자체가 가지고 있는 왕성한 분열능을 사용할 수 있으므로 체세포 변이가 없어

유전적으로 안정성이 높고, 생리적으로 균일한 세포주를 유도할 수 있다는 점에 착안하고 형성층 유래 줄기세포를 분리하였다.

[45] 본 발명에 따른 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포는 다음 중 적어도 하나의 특성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다:

[46] (a) 현탁배양 시 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 많은 수의 단세포를 포함하거나 작은 사이즈의 세포 집합체를 포함함;

[47] (b) 다수의 액포(vacuole)를 가지는 형태학적 특징을 나타냄;

[48] (c) 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 활성이 증가된 미토콘드리아를 가짐;

[49] (d) 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 성장속도가 빠르고 오랫동안 성장할 수 있음; 및

[50] (e) 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 생물반응기에서 전단 스트레스(shear stress)에 대해 낮은 민감성을 가짐.

[51] 이때, "다수의 액포"를 가진다고 함은, 은행나무과의 탈분화된 캘러스 등과 비교하여 2배 이상의 다수의 액포를 가짐을 말한다. 아울러, 본 발명에 따른 줄기세포는 은행나무과의 캘러스 등과 비교하여 크기면에서 작은 액포를 가진다. 아울러, "다수의 발달된 형태의 미토콘드리아"를 가진다고 함은, 은행나무과의 탈분화된 캘러스와 비교하여 현미경 하에서 활발하게 움직이는 미토콘드리아를 2배 이상의 다수 가짐을 말한다.

[52] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 상기 (a) 내지 (e)의 특성 중 적어도 두 개 이상의 특성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 상기 (a) 내지 (e)의 특성 중 적어도 세 개 이상의 특성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 (a) 내지 (e)의 특성 중 적어도 네 개 이상의 특성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 아울러, 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 (a) 내지 (e)의 특성을 모두 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[53] 아울러, 은행나무과 형성층 유래 줄기세포의 분화를 유도하여 도관요소(tracheary elements)로 분화할 수 있는 분화능을 가지고 있음을 확인하였다. 식물줄기세포를 특징짓는 특성에는 자가재생능력(self renewal)이외에 분화능(pluripotency)이 있는바, 이에 본 발명에 따른 은행나무과 형성층 유래 세포가 줄기세포임을 확인하였다.

[54] 한편, 본 발명에 따른 줄기세포는 (a) 은행나무과 식물로부터 형성층 함유 조직을 수득하는 단계; (b) 상기 수득된 형성층 함유 조직을 배지에서 배양하는 단계; 및 (c) 상기 형성층으로부터 세포들을 분리함으로써 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 단계를 포함하는 분리방법에 의하여 얻어질 수 있는데, 이때, 상기 (b) 단계는 형성층 함유 조직을 배양하여 형성층으로부터 증식되는 배양된 형성층을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 (c) 단계는 상기 배양된 형성층을 분리함으로써 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 것을 특징으로 할 수 있다. 아울러, 상기 (b)단계는 옥신(auxin)을 포함한 배지에서

배양하는 것을 특징으로 할 수 있는데, 이때, 옥신으로는 NAA (α -Naphthalene acetic acid) 또는 IAA (Indole-3-acetic acid)를 사용할 수 있으며, 이러한 옥신은 1~5mg/l의 농도로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 (c) 단계는 형성층 이외의 부분으로부터 무정형으로 증식되는 캘러스 층으로부터 상기 배양된 형성층을 분리함으로써 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [55] 본 발명의 일 실시예에서는 은행나무과 은행나무속인 은행나무로부터 은행나무의 형성층 유래 줄기세포를 분리하였으며, 이에 본 발명은 바람직하게는 은행나무속 식물의 형성층 유래 줄기세포임을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 은행나무의 형성층 유래 줄기세포임을 특징으로 할 수 있다.
- [56] 또한, 본 발명에서는, 상기에서 수득된 은행나무의 형성층 유래 줄기세포의 항산화 효과를 확인하였으며, 이에 본 발명은 다른 관점에서, 상기 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 함유하는 항산화용 조성물에 관한 것이다.
- [57] 본 발명에서 상기 배양물은, 상기 줄기세포를 엘리시터로서 3~5중량%의 원당 또는 설탕; 또는 메틸 자스모네이트(methyl jasmonate), 키토산, 페닐알라닌(phenylalanin), 벤조익산, ABA, 살리실산(salicylic acid) 및 아세트산 나트륨(sodium acetate) 중 어느 하나 이상을 포함하는 배지에서 추가로 배양하는 단계를 추가로 수행하여 수득된 것임을 특징으로 할 수 있다. 이때, 바람직하게는 상기 배지는 3~5중량%의 원당 또는 설탕; 및 메틸 자스모네이트(methyl jasmonate), 진균류 추출물, 세균류 추출물, 효모(yeast) 추출물, 키토산, 글루코만란(glucomanan), 글루칸(glucan), 페닐알라닌(phenylalanine), 벤조산(benzoic acid), 살리실산(salicylic acid), 아라키돈산(arachonic acid), STS, mevalonate N-benzoylglycine, ABA, SNP, IPP, BHT, CCC, 에테폰(ethephon), 히푸익산(hippuic acid), 암모니움 세릭 니트레이트(ammonium ceric nitrate), AgNO₃, 바나딜 설페이트(vanadyl sulfate), p-아미노벤조익산(p-aminobenzoic acid), 브라시노스테로이드(brassinosteroids), 소듐 알지네이트(sodium alginate), 아세트산 나트륨 (sodium acetate)로 구성되는 군에서 선택된 물질;을 포함하는 배지임을 특징으로 할 수 있다.
- [58] 본 발명에서 또한, 상기 줄기세포에 엘리시터로서 자외선, 열, 에틸렌, 항진균제, 항생제, 중금속 염 및 높은 염농도 등을 처리하여 물리적 화학적 스트레스를 가하여 수득된 배양물을 이용할 수 있다.
- [59] 본 발명에 있어서 또한, 상기 추출물은 증류수, 에탄올 등 알코올, 아세톤, DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 및 이들의 혼합용매로 구성된 군에서 선택된 용매를 이용하여 추출된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [60] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 줄기세포 추출물 및 그 배양물의 추출물이 산화제인 DPPH로 산화를 개시된 라디칼에 대한 소거능력이 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHT와 유사하거나 더 우수한 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명에 따른 줄기세포 추출물은 매우 우수한 항산화용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

- [61] 이에, 본 발명에서는 상기 줄기세포 또는 그 파쇄물을 함유하는 조성물이 항산화 활성을 나타냄을 제시하는 구체적인 실시예가 없다 하더라도, 상기에서 살펴본 바와 같이 그 줄기세포 및 그 배양물의 추출물이 항산화 활성을 가지는 것을 확인한바, 본 발명에 따른 줄기세포 자체나 그 파쇄물을 함유한 조성물의 경우에도 항산화 활성을 나타내어 산화를 억제할 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다고 할 것이다.
- [62] 본 발명에 따른 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물은 이들을 각각 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학 조성물로 제공될 수 있으며, 상기 줄기세포 등은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료 기간 등에 따라 적절한 약학적으로 유효한 양으로 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [63] 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [64] 상기 약학 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사 용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [65] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명에 따른 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 항산화용 기능성 식품에 관한 것이다.
- [66] 본원에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명에 따른 줄기세포 또는 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 첨가함으로써 식품의 기능성을 향상시킨 것을 의미한다.
- [67]
- [68] 실시예
- [69] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에

의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

- [70] 특히, 하기 실시예에서는 은행나무의 형성층 유래 줄기세포 추출물 및 그 배양물의 항산화 효과를 확인하였으나, 그 줄기세포 자체나 그 파쇄물을 사용해서도 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이라 할 것이다.

[71]

- [72] 실시예 1: 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포의 제조

[73]

- [74] 1-1: 식물재료의 준비

- [75] 은행나무과 은행나무속의 은행나무(*Ginkgo biloba*, 충청남도 부여, 대한민국)는 도 1과 같이, Phloroglycinol 염색을 통하여 목부(xylem)와 사부(phloem) 섬유를 관찰할 수 있는데, 이 사이에 형성층(cambium)이 존재함을 확인할 수 있다. 이러한 은행나무로부터 상기 형성층 유래 줄기세포를 수득하기 위하여, 먼저 은행나무의 줄기를 채취한 후, 즉시 항산화제 100mg/L 아스코르브산(L-ascorbic acid, DUCHEFA, The Netherlands) 용액에 침적하여 운송·보관하였다. 이때, 전형성층을 이용하여 동일한 줄기세포를 수득하기 위하여는 줄기 대신 잔가지를 채취한다.

- [76] 그 후, 1% 베노밀(benomyl, Dongbu Hannong Chemical, Korea), 1% 다코닐(daconil, Dongbu Hannong Chemical, Korea), 1% 스트렙토마이신(streptomycin sulphate, DUCHEFA, The Netherlands), 0.1% 세프트락심(cefotaxime sodium DUCHEFA, The Netherlands)의 혼합용액에 24시간 전처리 후 페놀 화합물(phenolic compound)과 잔존 화학물질을 제거하기 위하여 수돗물(tap water)로 30분간 세척하였다. 그리고, 70% 에탄올(ethanol, DC Chemical, Korea)에 1분, 30% 과산화수소(hydrogen peroxide, LG Chemical, Korea) 15분, 1% CLOROX 용액에 15분, 3% CLOROX 용액에 5분 표면 살균 후 3~4회 세척하였다.

[77]

- [78] 1-2: 줄기로부터 형성층 포함 절편체의 제조 및 조직 분리

- [79] 실시예 1-1의 살균과정을 거친 줄기 (전형성층 이용시 잔가지)의 중앙부위인 목부를 편셋으로 잡고 형성층이 포함된 수피(bark) 조직을 들어올리면 목부(xylem)에서 쉽게 벗겨졌다. 벗겨진 조직들은 형성층, 사부(phloem), 피층(cortex), 표피(epidermis)를 포함하는 절편체를 구성한다.

[80]

- [81] 1-3: 은행나무의 형성층 유래 줄기세포 유도단계

- [82] 상기 실시예 1-2에서 준비한 형성층 포함 절편체는 표 1의 줄기세포 유도배지(배지 1)에 치상하여 배양하였다.

[83]

[84] 표 1

세포주 유도배지 (배지 1)

	Composition	Contents(mg/L)
Inorganic salts	KNO ₃	2500
	(NH ₄) ₂ SO ₄	134
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	121.56
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	113.23
	KI	0.75
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	130.44
	H ₃ BO ₃	3
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
	FeNaEDTA	36.7
Vitamin	Myo-inositol	200
	Thiamine-HCl	20
	Nicotinic acid	2
	Pyridoxine-HCl	2
	L-ascorbic acid	50
	Citric acid	75
Amino acid	L-aspartic acid	133
	L-arginine	175
	Glycine	75
	Proline	115
Hormone	α-Naphtalene acetic acid	2
Sucrose		10,000
Activated charcoal		100
Gelrite		2,000

[85]

[86] 배지에 생장 조절제로서 NAA, IAA와 같은 옥신(Auxin)은 1~5mg/L의 농도로 첨가할 수 있는데, 바람직하게는 2mg/L의 농도로 첨가한다. 배양은 25±1°C로 조절된 암실에서 실시되었다.

[87] 초기 배양 4~7일째 형성층으로부터 세포 분열이 육안상으로 관찰되고, 배양 15일 이후에 사부·피층 및 표피로 이루어진 층으로부터 탈분화에 의한 무정형의

캘러스가 유도되기 시작하였다. 배양 30일 경과 후 배양된 형성층은 사부를 포함한 층, 즉 무정형의 캘러스층으로 분리되기 시작했고 (도 2A: 줄기세포(화살표), 사부(pholem) 세포(별표)), 두 층이 자연스럽게 분리될 때까지 기다렸다가 완벽한 분리가 이루어지면 각기 다른 페트리디쉬(petridish)에 분리 배양하였다. 분리 후, 생장률이 좋은 회고 무른 부분을 유도배지와 동일한 새로운 배지로 매 14일째 계대배양하였다. 도 2B는 상기 형성층 유래 줄기세포를 분리하여 3주간 배양한 후의 사진이다.

- [88] 한편, 비교를 위하여 은행나무의 수피(bark) 절편체를 소독한 후 상기 <표 1>의 배지에서 배양하였으며, 그 결과, 도 3B에 나타난 바와 같이, 수피(bark) 절편체는 탈분화에 의해 캘러스를 형성함을 관찰할 수 있었다. 수피 절편체에서 유도된 캘러스는 사부포함조직과 같이 여러 세포들 간의 분열 속도에 차이로 무정형을 이루었고, 생장률이 불안정하며 쉽게 갈변되는 경향을 보였다. 갈변 및 응집되어진 수피 절편체에서 유도된 캘러스는 종국에는 자신이 분비하는 페놀 화합물에 의해 생장이 둔해지다가 종국에는 괴사하였다. 즉, 6개월 후부터 수피로부터 유도된 캘러스들은 유지 및 배양이 어려웠다. 반면, 도 3A에 나타난 바와 같이, 은행나무의 형성층 유래 줄기세포는 장기 배양시 세포의 생장률, 생장 패턴, 응집 정도에 변이 없이 안정적으로 유지되어 대량 배양이 가능했다.

[89]

[90] 실시예 2: 은행나무속의 형성층 유래 줄기세포의 증식 및 특성관찰

[91]

[92] 상기 실시예 1에서 분리한 형성층 유래 줄기세포를 하기 <표 2>의 액상배지가 함유된 플라스크에 넣어 암조건에서 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 100rpm의 회전 교반기(shaker)에서 배양하였다. 계대배양 주기는 2주일로 고정함으로써 배양세포가 항상 대수생장기 상태에서 높은 활력을 유지할 수 있도록 하였다.

[93]

[94] 표 2

Suspension medium (배지 2)

	Composition	Contents(mg/L)
Inorganic salts	Ca(NO ₃) ₂	471.26
	NH ₄ NO ₃	400
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	180.54
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	72.5
	K ₂ SO ₄	990
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
	H ₃ BO ₃	6.2
	KH ₂ PO ₄	170
	FeNaEDTA	36.7
Vitamin	Myo-inositol	200
	Thiamine-HCl	20
	Nicotinic acid	2
	Pyridoxine-HCl	2
	L-ascorbic acid	50
	Citric acid	75
Amino acid	L-aspartic acid	133
	L-arginine	175
	Glycine	75
	Proline	115
Hormone	α-Naphtalene acetic acid	2
Sucrose		30,000

[95]

[96] 세포 응집정도(biological microscope CX31, Olympus, Japan)를 살펴 볼 때, 본 발명에 따른 줄기세포는 도 4A에 나타난 바와 같이, 현탁배양 시 많은 수의 단세포를 포함하며, 일부는 작은 사이즈의 세포 집합체로 존재하는 것을 확인할 수 있었으나, 대조군인 은행나무의 체세포(수피 조직에서 유도된 캘러스)의 경우, 도 4B에 나타난 바와 같이 응집됨을 관찰할 수 있었다.

[97] 한편, 도 5A에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 줄기세포는 다수개의 액포(vacuole)를 가지는 형태학적 특징을 관찰할 수 있었다. 이러한 특징은 식물체 내에 존재하는 미분화된 세포에서 압력 등과 같은 원인에 의하여 나타나는 특징으로서, 이에 본 발명에 따른 줄기세포는 미분화상태임을 확인할 수 있었다. 일반 은행나무의 체세포(수피 조직에서 유도한 캘러스)의 경우, 도

5B에 나타난 바와 같이, 이러한 특징을 확인할 수 없었다. 이를 더 상세히 살펴보기 위하여, 액포를 neutral red로 염색한 결과, 본 발명에 따른 줄기세포는 도 6A에 나타난 바와 같이 적색의 다수개의 작은 액포(vacuole)를 확인할 수 있었으며, 일반 은행나무의 체세포(수피 조직에서 유도한 캘러스)의 경우 도 6B에 나타난 바와 같이, 하나의 큰 중심액포가 존재함을 확인할 수 있었다.

[98] 한편, 본 발명에 따른 줄기세포는 광학현미경 BX41TF를 통해 관찰한 결과, 움직임 면에서 활성이 매우 높은 미토콘드리아를 다수 개 관찰할 수 있었다. 도 7A는 본 발명에 따른 줄기세포가 다수개의 미토콘드리아를 가짐을 나타내는 것으로 화살표는 미토콘드리아를 나타낸다. 이에 반하여, 일반 은행나무의 체세포(수피 조직에서 유도한 캘러스)의 경우, 도 7B에 나타난 바와 같이, 이러한 특징을 확인할 수 없었다.

[99] 한편, 배양기간별 증식속도를 측정하기 위하여, 3L의 내용적을 갖는 공기 부양식 생물반응기(airlift bioreactor, 삼성과학, Korea)를 이용하여 세포배양물의 성장속도를 측정한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 1주일 배양 시 2배, 2주일 배양 시 총 3배의 성장율을 확인할 수 있었다. 이때, 배지는 <표 2>의 액상배지를 사용하였고, 압조건에서 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 유지하였다. 아울러, 이와 동일한 배지와 조건으로 3L의 공기 부양식 생물반응기에서 은행나무 수피조직에서 유도한 캘러스와 본 발명에 따른 은행나무의 형성층 유래 줄기세포를 배양하여 서로 비교하였다.

[100]

[101] 표 3

성장속도 및 GI 측정결과

Cell lines	Growth rate (folds)	GI
Stem Cell	3.1	2.27
Callus	2.3	1.3

[102]

[103] 그 결과, <표 3> 및 도 9에 나타난 바와 같이, 은행나무 수피조직에서 유도한 캘러스의 성장속도는 2.3배이고, GI (growth index = (maximum DCW - initial DCW) / initial DCW)는 1.3에 불과하였으나, 본 발명에 따른 형성층 유래 줄기세포는 성장속도가 3.1배이고, GI가 2.27로 은행나무 수피조직에서 유도한 캘러스에 비하여 높음을 확인할 수 있었다. 통상 반응기의 경우 반응기 내에서의 성장고리 (growth ring) 생성과 배양중의 식물 배양체 응집성과 세포벽이 단단하여 전단에 대한 민감성으로 세포 생존율(cell viability)이 급격히 감소하나, 형성층 유래 줄기세포 배양물은 생물반응기 내의 성장고리 면적을 아주 작게 형성하고, 배양기에 간단한 자극을 주어 배지를 움직여주면 내벽의 링(ring)이 간단하게 해소되었다. 또한 응집이 작고, 많은 액포(vacuole)를 가지고 있어

전단에 대한 민감성이 약하여 세포 생존율(cell viability)이 거의 감소하지 않았다.

[104]

[105] 표 4

대량배양 공정

	Bioreactors	Max. dry cell weight (g/L)
A	3L air-lift bioreactor	11.3
B	20L air-lift bioreactor	10.1
C	250L air-lift bioreactor	11.7

[106]

[107] 아울러, <표 4> 및 도 10에서 볼 수 있듯이, 3L 공기부양식 생물반응기, 20L 공기부양식 생물반응기 및 250L 공기부양식 생물반응기에서 10일간 배양한 결과, 250L와 같이 대량배양시에도 증식됨을 확인할 수 있었으며, 250L의 대량배양시 오히려 리터당 건조세포 양이 증가한 것으로 나타났다.

[108] 즉, 본 발명에 따른 형성층 유래 줄기세포는 대량배양을 위한 생물 반응기에서 전단 스트레스에 대하여 낮은 민감성을 가지므로, 생물반응기 내에서 급속 대량 생장이 가능함을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 형성층 유래 줄기세포가 은행나무의 탈분화된 캘러스 유래 세포주에 비하여 전단스트레스에 대하여 낮은 민감성을 가짐을 알 수 있었다.

[109] 한편, 은행나무 수피조직에서 유도한 캘러스와 본 발명에 따른 은행나무 형성층 유래 줄기세포에 대하여 동결보존을 실시하였다. 현탁배양물은 배양 6일에서 8일 된 것을 사용하며, 동결보존제는 0.5M glycerol(DUCHEFA, The Netherlands)과 0.5M DMSO(DUCHEFA, The Netherlands)와 1M sucrose(DUCHEFA, The Netherlands) 포함된 배지이고, 5ml cryovial(Duran, USA)에 옮겼다. 동결보존제에 처리되는 세포 접종량은 200mg/ml 이다. 동결보존제 처리된 현탁세포는 30분간 냉동고에 유지한 다음 deep freezer에 3시간 보관 후 액체질소에 침지시켜 냉동시켰다.

[110] 그 후 해빙을 위하여 액체질소에 20분 이상 유지된 배양세포를 꺼내어 40°C 항온수조에 넣고 1~2분간 해동시켰다. 세포 재생장을 위해, 세포 현탁액을 무균상태의 깔때기 및 여과지를 사용하였다. 여과된 세포는 filter paper가 포함된 고형생장배지상에 적용시키고 30분간 실온에서 안정화 시킨 다음, 다시 신선한 고형생장배지로 다시 옮겨졌다.

[111]

[112] 표 5

동결보존 시 생존율 측정 결과

Stem cell	33/212	43/218	45/211	18.87%
	15.60%	19.70%	21.30%	
Callus	5/175	4/124	4/158	2.87%
	2.90%	3.20%	2.50%	

[113]

[114] 그 결과, 도 11 및 표 5에서 볼 수 있듯이, 은행나무 수피조직에서 유도한 캘러스는 본 발명의 은행나무 형성층 유래 줄기세포에 비하여 매우 낮은 생존율을 보임을 확인할 수 있었다.

[115] 아울러, 식물줄기세포를 특징짓는 특성에는 자가재생능력(self renewal)이외에 분화능(pluripotency)이 있다. 이에 은행나무 형성층 유래 줄기세포의 도관요소 분화를 유도하기 위하여, 생장조절제가 포함된 MS medium 조건에서 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 암조건에서 배양한 결과, 형성층 유래 줄기세포로부터 도관요소가 분화됨을 확인할 수 있었다.

[116]

[117] 실시예 3: 엘리시터의 처리 및 은행나무의 형성층 유래 줄기세포의 추출물 제조

[118]

[119] 3-1: 엘리시터의 처리

[120] 실시예 2와 같이 14일간 현탁배양한 줄기세포를 수거하여 2가지 처리구로 나누어 실험을 수행하였다. 즉, (1) 상기 14일간 현탁배양한 세포주(growth phase), (2) 상기 14일간 현탁배양한 세포주를 멸균수에 원당 3~5중량%(g/L) 및 메틸 자스모네이트 100 μM 를 첨가한 배지에서 14일간 암배양한 세포주(elicitation phase)를 이용하였다.

[121]

[122] 3-2: 추출물의 제조

[123] 상기 두 세포주를 각각 배양액을 제거시킨 다음 동결건조한 동결건조세포주(Dry) 2g에 50ml의 80% 에탄올로 15°C 에서 48시간 교반시키면서 용해시켰다. 상기 용해 후, 3,000rpm에서 20분간 원심분리시켜 상층액을 동결건조하여 얻은 추출분말을 PBS에 용해시킴으로써, 상기 두 세포주에 대한 에탄올 추출물을 각각 수득하여 사용하였다.

[124]

[125] 실시예 4: 은행나무의 형성층 유래 줄기세포 추출물의 항산화 효과 확인

[126]

[127] 본 발명에 따른 줄기세포의 항산화 효과를 확인하기 위하여, 산화제인 DPPH로 산화를 개시시킨 다음 실시예 3-2의 각 에탄올 추출물의 라디칼(radical)에 대한

소거능력을 측정하였다.

[128] 즉, 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 실시예 3-2의 각 에탄올 추출물 20 μ l와 100 μ M의 DPPH 용액 180 μ l를 넣어준 후 상온에서 20분동안 반응시켜 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHT를 사용하였으며, 라디칼 소거능은 백분율로 나타내었다.

[129] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 엘리시터를 처리하지 않은 14일간 현탁배양한 세포주로부터 수득한 에탄올 추출물 (GG-E: growth phase ethanol extract)의 경우 농도가 증가할수록 항산화력이 증가하는 것으로 나타났으며, 2.5mg/ml에서는 합성 항산화제로 널리 사용되고 있는 BHT와 유사한 항산화력을 갖는 것으로 나타나 우수한 항산화력을 가지는 것으로 나타났다. 또한, 엘리시터로 원당과 메틸자스모네이트를 처리한 세포주로부터 수득한 에탄올 추출물 (GP-E: elicitation phase ethanol extract)도 농도가 증가함에 따라 항산화력이 증가하였으며, 2.5mg/ml의 농도에서는 BHT보다 더 높은 항산화 활성을 나타내었다. 이러한 실험결과는 본 발명에 따른 형성층 유래 줄기세포가 우수한 항산화 효과가 있음을 제시한다.

[130]

[131] 제조예 1: 약학제제 제조예

[132]

[133] 제제예 1-1: 정제의 제조

[134] 실시예 3에서 제조된 줄기세포 추출물 100mg을 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합하여 통상의 정제제조방법에 따라 제조하였다.

[135]

[136] 제제예 1-2: 캡슐제의 제조

[137] 실시예 3에서 제조된 줄기세포 추출물 500mg을 연질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[138]

[139] 제제예 1-3: 시럽제의 제조

[140] 실시예 1에서 수득한 줄기세포 1g, 이성화당 10g, 만니톨 5g, 적량의 정제수의 함량으로 통상적인 액제제의 제조방법에 따라 100ml의 시럽제를 제조하였다.

[141]

[142] 제제예 1-4: 주사제의 제조

[143] 실시예 3에서 제조된 줄기세포 추출물 200mg을 폴리옥시에틸렌 수소화 카스트로 오일을 함유하는 생리 식염수 200mg에 가열 용해시켜 혼합 추출물을 0.1%의 농도로 함유하는 주사제를 제조하였다.

[144]

[145] 제조예 2: 기능성 식품의 제조

[146]

[147] 제조예 2-1: 기능성 음료의 제조

[148] 실시예 1에서 수득한 줄기세포 200mg을 96ml의 물에 용해시킨 후 보조제로서 비타민 C 500mg, 교미제로서 구연산, 올리고당을 각각 1g 가하고, 보존제로서 나트륨벤조에이트 0.05g을 가한 후 정제수를 가하여 전량을 100ml로 만들어 기능성 음료를 제조하였다.

[149]

[150] 제조예 2-2: 기능성 음료의 제조

[151] 실시예 3에서 제조한 줄기세포 추출물 200mg을 96ml의 물에 용해시킨 후 보조제로서 비타민 C 500mg, 교미제로서 구연산, 올리고당을 각각 1g 가하고, 보존제로서 나트륨벤조에이트 0.05g을 가한 후 정제수를 가하여 전량을 100ml로 만들어 기능성 음료를 제조하였다.

[152]

산업상 이용가능성

[153] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포는 탈분화과정없이 미분화상태로 분리되어 장기 배양시에도 세포생장률과 생장패턴에 변이 없이 안정적으로 유지되어 대량 배양이 가능하여 유용하다. 아울러, 본 발명에 따른 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포는 산화제 처리에 의하여 발생하는 라디칼 소거능을 측정한 결과, 기존의 합성 항산화제와 유사하거나 더 높은 항산화효과를 가지는 것으로 나타남바, 우수한 항산화용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[154] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 은행나무과 (family *Ginkgoaceae*)의 형성층에서 유래되고, 탈분화를 거치지 않은 선천적 미분화세포인 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 다음 중 적어도 하나의 특성을 추가로 가지는 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포:
 (a) 현탁배양 시 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 많은 수의 단세포를 포함하거나 작은 사이즈의 세포 집합체를 포함함;
 (b) 다수의 액포(vacuole)를 가지는 형태학적 특징을 나타냄;
 (c) 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 활성이 증가된 미토콘드리아를 가짐;
 (d) 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 성장속도가 빠르고 오랫동안 성장할 수 있음; 및
 (e) 은행나무과의 탈분화된 캘러스에 비하여 생물반응기에서 전단 스트레스(shear stress)에 대해 낮은 민감성을 가짐.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 (a) 내지 (e)의 특성 중 적어도 두 개의 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 (a) 내지 (e)의 특성 중 적어도 세 개의 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 (a) 내지 (e)의 특성 중 적어도 네 개의 특성을 가지는 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 (a) 내지 (e)의 특성을 모두 가지는 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포는 다음의 단계를 포함하는 분리방법에 의하여 분리된 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포:
 (a) 은행나무과 식물로부터 형성층 함유 조직을 수득하는 단계;
 (b) 상기 수득된 형성층 함유 조직을 배지에서 배양하는 단계; 및
 (c) 상기 형성층으로부터 세포들을 분리함으로써 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 단계.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무속(genus *Ginkgo*)인 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무(*Ginkgo biloba*)인 것을 특징으로 하는 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포.
- [청구항 10] 다음의 단계를 포함하는 은행나무과(family *Ginkgoaceae*)의

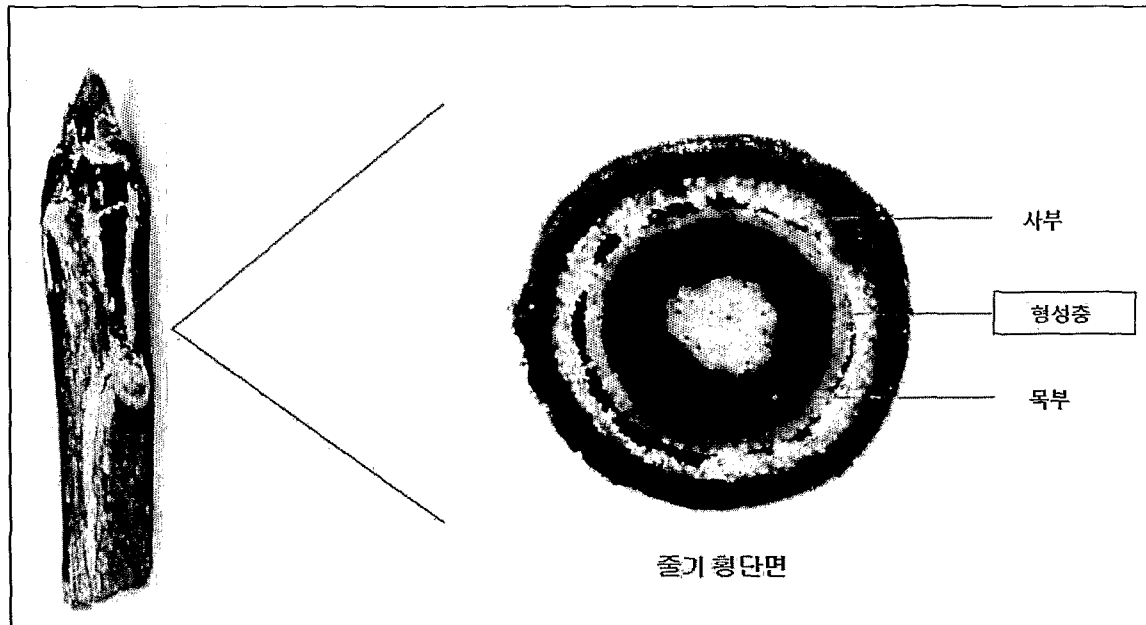
형성층 유래 줄기세포의 분리방법:

(a) 은행나무과 식물로부터 형성층 함유 조직을 수득하는 단계;
(b) 상기 수득된 형성층 함유 조직을 배지에서 배양하는 단계; 및
(c) 상기 형성층으로부터 세포들을 분리함으로써 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 단계.

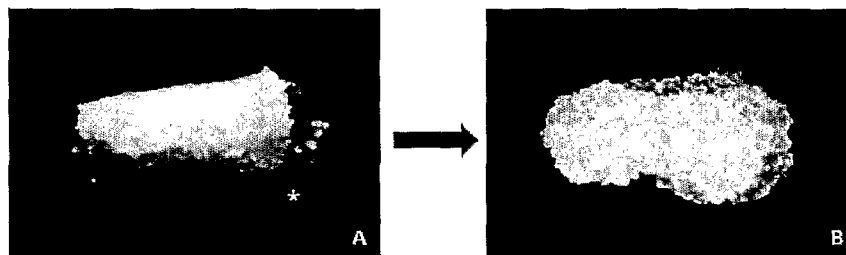
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 (b)단계는 옥신(auxin)을 포함한 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 옥신은 1~5mg/l의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 (c)단계는 배양된 형성층을 형성층 이외 부분으로부터 유래된 부정형으로 증식되는 캘러스층으로부터 나누어지게 한 다음, 형성층으로부터 세포들을 분리하여 형성층 유래 줄기세포를 수득하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제10항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무속(genus *Ginkgo*)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제10항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 함유하는 향산화용 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 배양물은 상기 줄기세포를 3~5중량%의 원당 또는 설탕; 또는 메틸 자스모네이트(methyl jasmonate), 진균류 추출물, 세균류 추출물, 효모(yeast) 추출물, 키토산, 글루코마난(glucomanan), 글루칸(glucan), 페닐알라닌(phenylalanine), 벤조산(benzoic acid), 살리실산(salicylic acid), 아라키돈산(arachonic acid), STS, mevalonate, N-benzoylglycine, ABA, SNP, IPP, BHT, CCC, 에테폰(ethephon), 히푸익산(hippic acid), 암모니움 세릭 니트레이트(ammonium ceric nitrate), AgNO₃, 바나딜 설페이트(vanadyl sulfate), p-아미노벤조익산(p-aminobenzoic acid), 브라시노스테로이드(brassinosteroids), 소듐 알지네이트(sodium alginate) 및 아세트산 나트륨 (sodium acetate) 중 어느 하나 이상을 포함하는 배지에서 추가로 배양하여 수득된 것임을 특징으로 하는 향산화용 조성물.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무속(genus *Ginkgo*)인 것을 특징으로 하는 향산화용 조성물.
- [청구항 19] 제16항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무인 것을 특징으로 하는 향산화용 조성물.

- [청구항 20] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 은행나무과의 형성층 유래 줄기세포, 그 추출물, 그 파쇄물 및 그 배양물 중 어느 하나 이상을 함유하는 항산화용 기능성 식품.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 배양물은 상기 줄기세포를 3~5중량%의 원당 또는 설탕; 또는 메틸 자스모네이트(methyl jasmonate), 진균류 추출물, 세균류 추출물, 효모(yeast) 추출물, 키토산, 글루코만란(glucomanan), 글루칸(glucan), 페닐알라닌(phenylalanine), 벤조산(benzoic acid), 살리실산(salicylic acid), 아라키돈산(arachonic acid), STS, mevalonate, N-benzoylglycine, ABA, SNP, IPP, BHT, CCC, 에테폰(ethephon), 히푸익산(hippuic acid), 암모니움 세릭 니트레이트(ammonium ceric nitrate), AgNO₃, 바나딜 설페이트(vanadyl sulfate), p-아미노벤조익산(p-aminobenzoic acid), 브라시노스테로이드(brassinosteroids), 소듐 알지네이트(sodium alginate) 및 아세트산 나트륨 (sodium acetate) 중 어느 하나 이상을 포함하는 배지에서 추가로 배양하여 수득된 것임을 특징으로 하는 항산화용 기능성 식품.
- [청구항 22] 제20항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무속(genus *Ginkgo*)인 것을 특징으로 하는 항산화용 기능성 식품.
- [청구항 23] 제20항에 있어서, 상기 은행나무과는 은행나무인 것을 특징으로 하는 항산화용 기능성 식품.

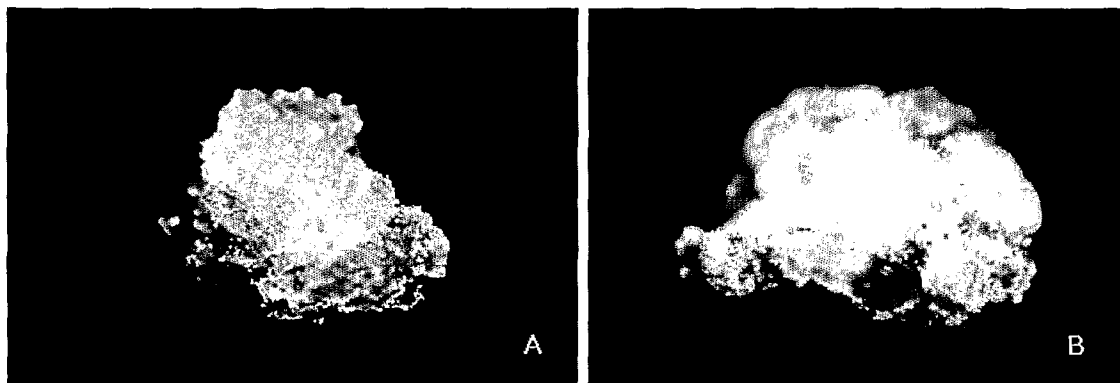
[Fig. 1]



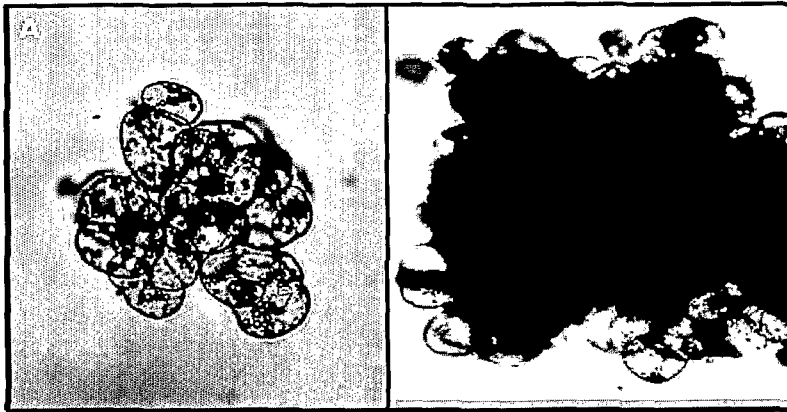
[Fig. 2]



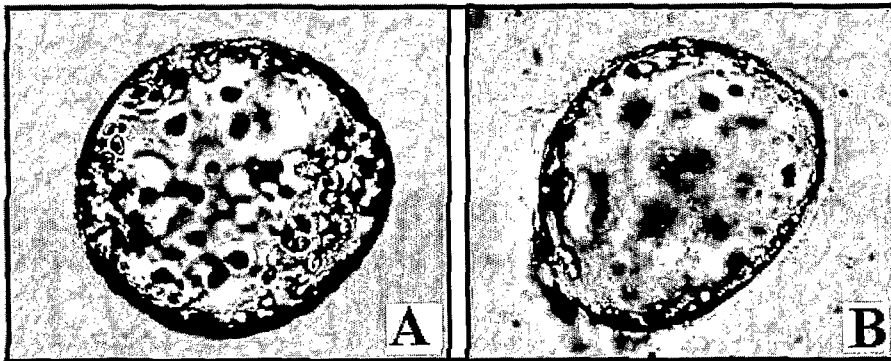
[Fig. 3]



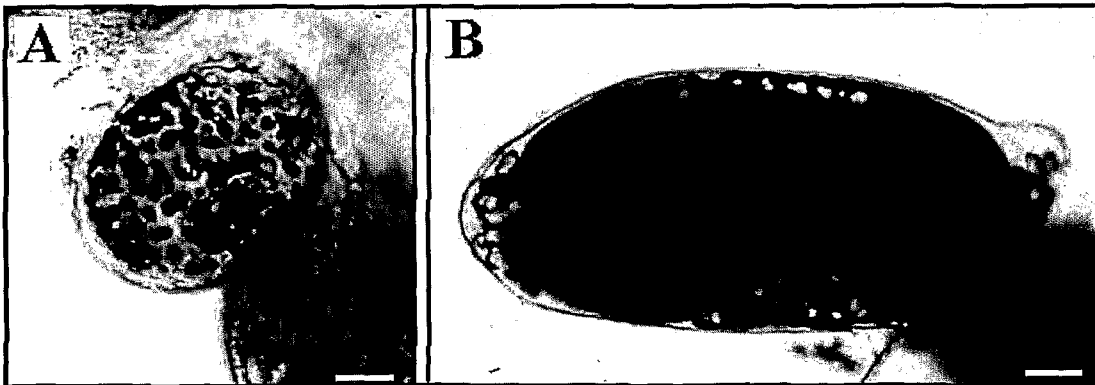
[Fig. 4]



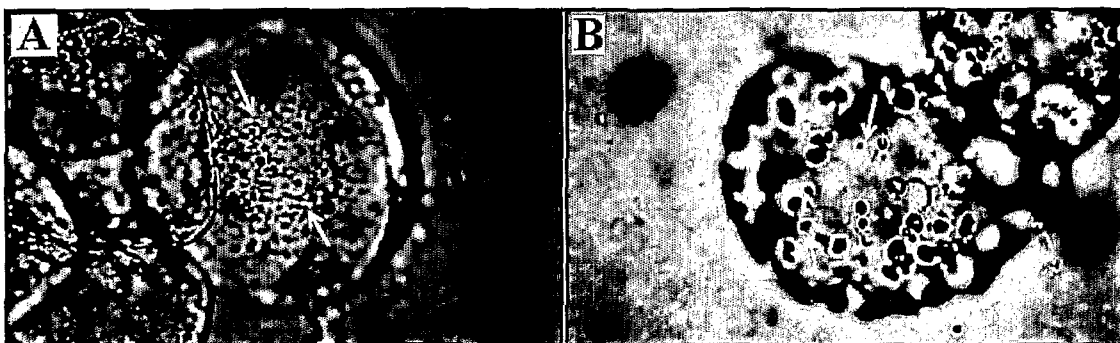
[Fig. 5]



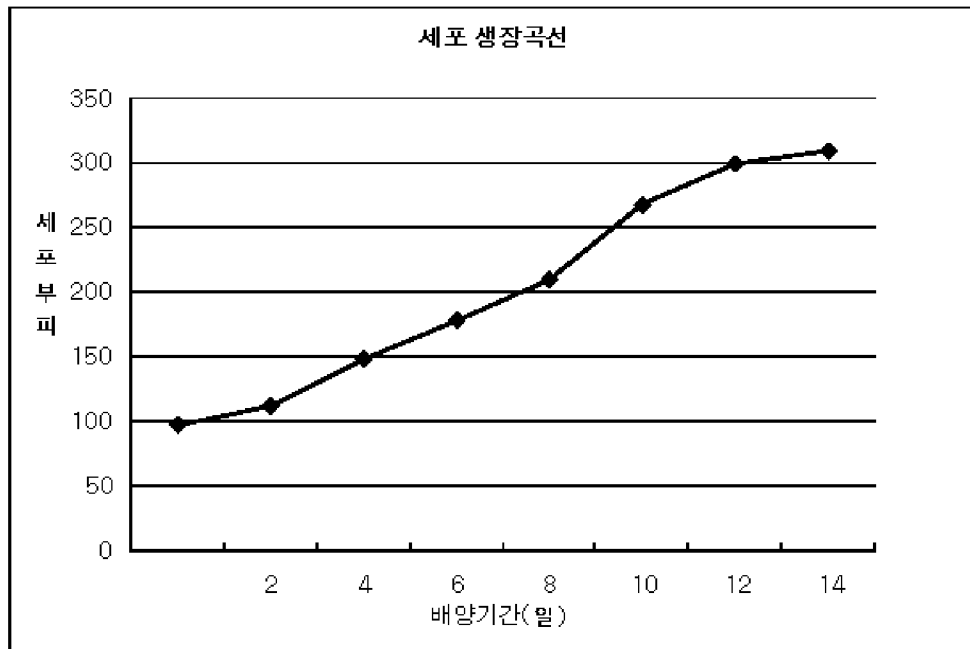
[Fig. 6]



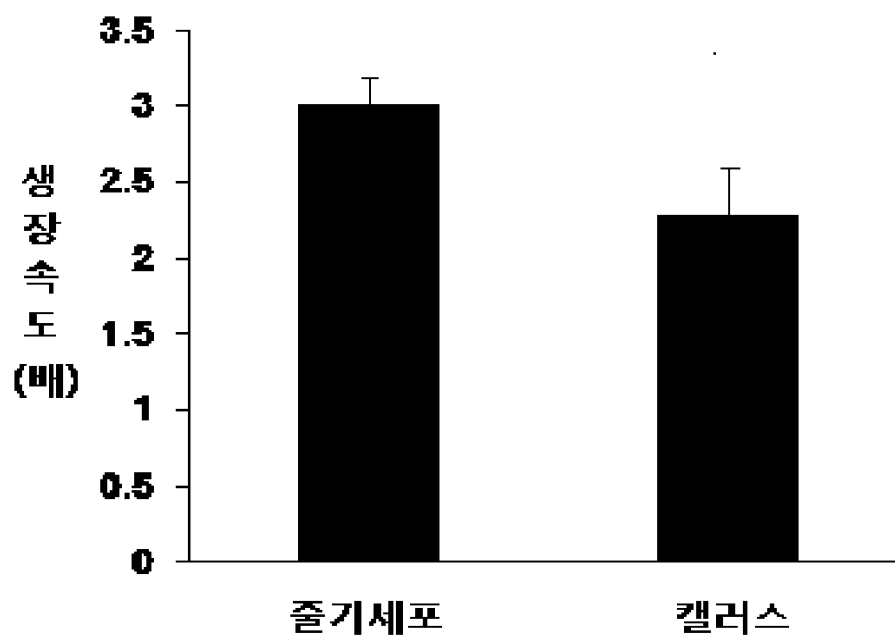
[Fig. 7]



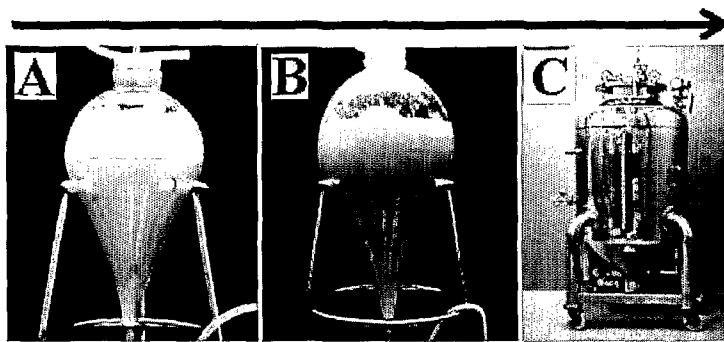
[Fig. 8]



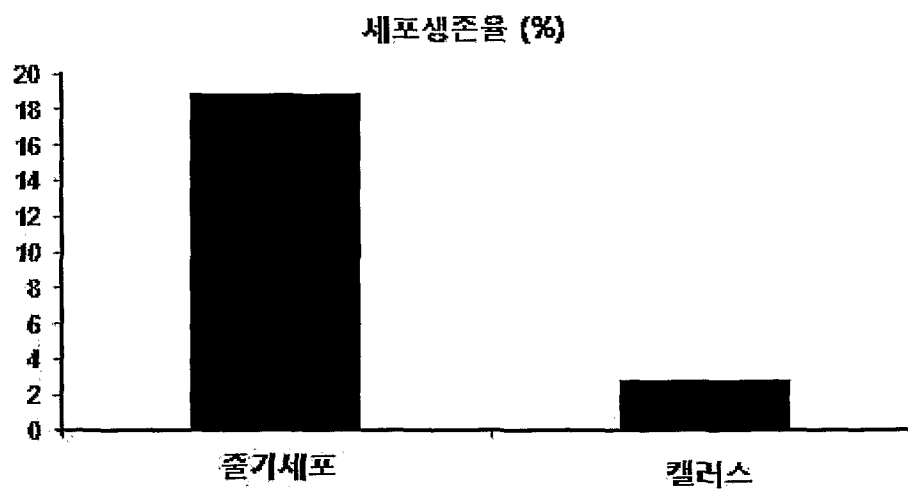
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]

