

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0102041
(43) 공개일자 2021년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61K 35/12* (2020.01) *A61P 17/14* (2006.01)*C12M 1/12* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0628 (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0152233

(22) 출원일자 2020년11월13일

심사청구일자 2020년11월13일

(30) 우선권주장

1020200015462 2020년02월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인

주식회사 마이크로바이오틱스

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 221호(신촌동,
연세대학교의과대학 임상의학연구센터)

(72) 발명자

용동은

서울특별시 강남구 언주로30길 13, 대림아크로빌
A705

박철순

충청북도 충주시 신호5길 1

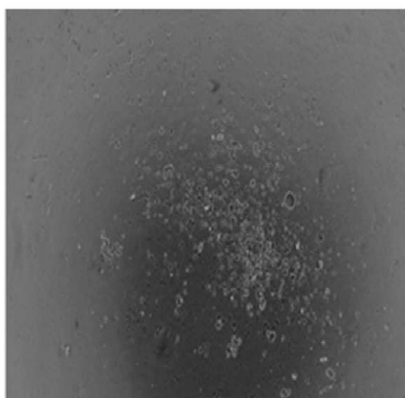
(74) 대리인

파도특허법인(유한), 이재영

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **모낭조직 배양액을 포함하는 탈모의 예방 또는 치료용 조성물****(57) 요약**

본 발명은 모낭세포 배양액을 포함하는 모낭 형성 촉진용 조성물 및 이를 이용한 다양한 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4

Y-27632+I-Matrix

(52) CPC특허분류

A61K 35/12 (2013.01)
A61P 17/14 (2018.01)
C12M 25/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
C12N 2501/113 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2533/52 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545017445
과제번호	918003-4
부처명	농림수산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	포스트게놈 신산업육성을 위한 다부처유전체사업
연구과제명	감염 억제 및 장 염증 완화 기능 프로바이오틱스 균주 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.04.25 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030988
과제번호	HI14C1324
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D사업
연구과제명	마이크로바이옴 활용 감염 및 면역질환 치료기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계;
상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계;
상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및
상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는, 탈모의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 모낭세포는 모낭조직에서 유래한 세포인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 모낭조직은 모간(hair shaft)이 부착된 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 모낭세포를 제거하는 (e)단계;를 더 포함하는, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 ROCK 저해제는 Y-27632, HA-1077, Y-39983 및 Wf-536으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 기저막단백질은 라미닌인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,
표피 성장인자(Epidermal growth factor; EGF) 및 섬유아세포 성장인자(Fibroblast growth factor; FGF)를 더 포함하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 FGF는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21 및 FGF23으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 EGF와 상기 FGF4의 농도비는 1:10 내지 10:1인, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 EGF의 농도는 10ng/ml 내지 500ng/ml이고, 상기 FGF4의 농도는 10ng/ml 내지 500ng/ml인, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 배지는 돌배코 변형 이글배지(Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM), 항생제 및 태아소혈청(Fetal bovine serum; FBS)을 더 포함하는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 항생제는 0.1% 내지 5%인 페니실린인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 배지는 bFGF를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 배지는 b27을 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 (c)단계에서 상기 모낭세포를 세포의 매트릭스로 코팅한 뒤 제2용기에 부착하는, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 세포의 매트릭스는 매트릭젤(Matrigel), NuFF 배양보조세포(feeder cell) 및 겔트렉스(Geltrax)로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것인, 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 (b) 및 (d) 단계에서 배양하는 기간은 20 내지 40일인, 조성물.

청구항 18

제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계;

상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계;

상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및

상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는, 탈모의 예방 또는 완화용, 화장품 조성물.

청구항 19

제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계;
상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계;
상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및
상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는, 상처의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 20

제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계;
상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계;
상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및
상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는, 상처의 예방 또는 완화용 화장품 조성물.

청구항 21

제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계;
상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계;
상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및
상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는, 피부 개선용 약학적 조성물.

청구항 22

제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계;
상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계;
상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및
상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는, 피부 개선용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모낭조직배양액을 포함하는 탈모의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모낭이란 모근을 싸고 있는 주머니 모양의 상피성 조직을 말하며, 모근이란 모발이 피부에 박힌 부분을 말한다. 모발은 모낭 근처에서 세포 분열이 활발히 일어나 성장하게 된다. 만약 이 세포 분열 능력이 저하되면 모낭은 위축하게 되고 피부의 얇은 부위로 이동한다. 정상적으로는 세포 분열 능력을 다시 획득하게 되어 생성된 신생 세포군이 피부의 깊은 곳으로 이동하여 새로운 모낭이 형성되고 모발이 자라나 묵은 모발을 밀어내는데, 이와 같은 '모발의 교환'이 일어나지 않으면 탈모증이 되는 것이다.

[0003] 지금까지 개발된 탈모의 최적 치료방법은 모발이식이지만, 탈모 초기에는 FDA 승인을 받아 시중에 판매되는 외용제 미녹시딜 (Minoxidil)이나 경구투여제인 피나스테라이드 (finasteride)를 주성분으로 하는 프로페시아 (Propecia) 등으로도 탈모 진행을 둔화시킬 수 있다.

[0004] 초기 탈모 치료에 유용한 유효물질을 찾아내기 위해, .쥐를 제모한 후 시료를 등에 도포한 후 발모현상을 관찰한 것, 쥐의 콧수염을 이용한 생체 외 기관배양을 통해 IGF (Insulin-like growth factor), EGF (Epidermal growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 등의 성장인자의 영향을 확인하는 동물 실험을 진행해왔지만

일정한 주기로 털갈이를 하는 설치류와 달리 사람은 모낭마다 별개의 주기를 가지고 있기 때문에 성장인자에 대한 경향이 모두 일치하지는 않았다. 반면, 원숭이 모델의 경우 사람과 경향은 유사하지만 시간과 실험비용의 부담이 너무 크다. 또한, 최근 동물 보호 차원에서 동물을 이용한 생체 실험이 사회적으로 비판을 받고 있으며 법적으로도 규제가 되고 있어서, 동물 시험을 대체할 생체 외독성 검사 모델의 개발이 전 세계적인 문제로 대두되고 있다.

[0005] 생체 실험과 달리 생체 외 실험의 경우에는, 세포 배양시 혈관을 통한 영양이나 산소 공급이 차단된 상황이므로 장기간의 실험에 어려움이 있다. 또한, 효능성분의 효과를 확인하기 전에 인공조직의 급속한 세포사로 인해 실험이 종결되는 상황이 생길 수 있으므로 생체 외 실험의 경우 인공조직의 기능을 생체와 유사한 환경으로 조성하여 장기간 유지시키는 것이 가장 중요하다.

[0006] 모낭 기관 배양을 이용한 체외 모발 성장모델로는 액침 배양으로 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 혈청을 10 중량% 첨가한 후 유리병 안에서 배양한 연구, 산소압을 증가시키고 31℃에서 RPMI 1640 배지로 배양하는 경우, 일반적인 배양 온도인 37℃에서 배양하는 것보다 길이 성장속도와 길이 증가량은 감소되지만 모구의 형태변화는 적게 나타난 것들이 있다.

[0007] 2000년 이후로 보편적으로 사용되는 모낭 기관 배양을 위한 배지는 필팟(Philpott)이 개발한 것으로, 윌리엄 배지 E(Williams' medium E)에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린 (insulin), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 트랜스페린 (transferrin), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 소듐 셀레나이트(sodium selenite) 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 하이드로코티손 (hydrocortisone)이 첨가된 배지 조성을 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 첨가한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계; 상기 제1용기에 배지를 처리한 후, 세포 배양기에서 배양하는 (b)단계; 상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및 상기 제2용기에 상기 배지를 첨가한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭 세포 배양액을 포함하는 모낭 형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 이하, 본원에 기재된 다양한 구현예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구현예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구현예" 또는 "구현예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구현예에서" 또는 "구현예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0011] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당 업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 처리한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계; 상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계; 상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및 상기 제2용기에 상기 배지를 처리한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는 모낭 형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명에서, "ROCK 저해제"란 Rho 키나아제에 의해 매개되는 시그널을 저해할 수 있는 물질을 말한다. ROCK는 평활근 수축, 액틴 세포골격 조직(actin cytoskeleton organization), 혈소판 활성화, 미오신 포스포타제 세포 유착, 이동, 증식 및 생존의 하향조절(downregulation), 대동맥 평활근 세포(aortic smooth muscle cells)의

트롬빈-유도 반응, 심근세포의 비대(hypertrophy of cardiomyocytes), 기관지 평활근 수축, 평활근 수축 및 비-근육 세포의 세포골격 재조직, 용량-조절된 음이온 채널의 활성화, 신경돌기 수축(neurite retraction), 상처치유(wound healing), 세포변형 및 유전자 발현과 같은 다양한 세포 기능에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어 상기 ROCK 저해제는 4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-pyridin-4-ylcyclohexane-1-carboxamide (Y-27632), HA-1077, Y-39983 및 Wf-536으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 Y-27632일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0015] 본 발명에서 진피와 표피의 접합에 있어 기저막(basement membrane: BM)은 여러가지 기능을 가지며, 가장 명백한 기능은 표피와 진피를 근접 연결시키는 것이며, 이러한 방식으로 2층의 조직들의 기계적으로 안정적인 점착(cohesion)을 확보한다. 또한 기저막은 표피의 "극성"과 구성에도 영향을 주는 동시에 표피와 진피 사이에 명확한 경계가 된다. 기저막은 각질형성 세포의 표피 분화를 개시하고, 기저 세포층의 증식적인 상태를 유지시키는 것으로 추정된다. 정상 조건하에서는, 기저막은 또한 표피 세포와 진피의 직접 접촉을 방지한다. 그러나, 기저막에 손상이 가해지는 상처가 발생되면, 진피와의 직접 접촉이 이루어지게 되고, 그런 후 세포는 행태를 변화시켜 상처치유 과정을 개시하게 된다.
- [0016] 본 발명에서, "기저막단백질"이란 기저막을 구성하는 단백질을 말한다. 이에 한정하지는 않지만, 예를 들어 상기 단백질은 라미닌 또는 합성 라미닌 511 E8 프래그먼트이다. 상기 합성 라미닌 511 E8 프래그먼트는 세포 접착 활성을 향상시킨 라미닌 개변체로서 알려져 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 기저막단백질은 라미닌일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 라미닌은 합성 라미닌 511 E8 프래그먼트 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서, "모낭(hair follicle)"이란 모근을 싸고 있는 주머니 모양의 상피성 조직을 말하며, 모근이란 모발이 피부에 박힌 부분을 말하고, "모낭세포"란 모낭조직에서 채취할 수 있는 세포를 포함하고 이에 한정하지는 않지만, 예를 들어 모낭줄기세포(Follicle associated stem cell), 진피유두세포(Human Hair Follicle Dermal Papilla Cell), 모모세포(Human Hair Follicle Germinal Matrix Cell), 제정맥 내피세포(Human umbilical vein endothelial cell)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 제1용기 및 상기 제2용기는 통상적으로 세포배양을 위해 사용되는 24웰, 96웰, 384웰 등의 멀티 플레이트 또는 배양기이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명에서 상기 모낭세포는 모낭조직에서 유래한 세포일 수 있다. 상기 모낭조직은 모간(hair shaft)이 부착된 것일 수 있다. 상기 모간은 두피 표면 위에 드러나는 부분으로, 모발의 대부분을 차지하며, 그 단면을 잘라서 현미경으로 확대해 보면 바깥 층으로 모표피(cuticle), 모피질(cortex), 모수질(medulla)의 세 층으로 나뉘어진다.
- [0021] 본 발명에서 상기 모낭세포를 제거하는 (e)단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서, "배양액"이란 세포를 배양 배지에서 배양하여 수득한 것을 의미한다. 상기 배양액은 세포를 포함 또는 불포함 할 수 있다. 세포 불포함 배양액을 제조하는 방법은 공지된 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 세포를 배양한 후 세포배양액을 회수하고, 회수된 배양액을 마이크로 시린지 필터를 이용하여 여과하거나 원심분리를 함으로써 세포가 제거된 세포 불포함 배양액을 얻을 수 있다. 마이크로 필터의 세공 크기(pore size)는 세포를 제거할 수 있는 크기 내에서 적절하게 선택할 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 10 μ m이다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 상기 배양액에 표피 성장인자(Epidermal growth factor; EGF) 및 섬유아세포 성장인자(Fibroblast growth factor; FGF)를 더 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에서 표피성장인자 (Epidermal growth factor; EGF)는 수용체 EGFR에 결합하여 세포 성장, 증식, 분화를 촉진하며, 인간 EGF는 53개의 아미노산으로 이루어진다 (Exp Cell Res., 284(1):2-13, 2003). 또한 이와 같은 EGF는 피부 및 헤어의 재생에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다(J Dermatol Sci., 72(2):81-86, 2013).
- [0025] 본 발명에서 상기 섬유아세포 성장인자(Fibroblast growth factor; FGF)는 FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21 및 FGF23으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에서 상기 EGF와 상기 FGF4의 농도비는 1:10 내지 10:1일 수 있다. 상기 EGF의 농도는 10ng/ml 내지

500ng/ml이고, 상기 FGF4의 농도는 10ng/ml 내지 500ng/ml 일 수 있다.

- [0027] 본 발명에서 상기 배지는 돌베코 변형 이글배지(Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM), 항생제 및 태아소혈청(Fetal bovine serum; FBS)을 더 포함할 수 있다. 상기 항생제는 0.1% 내지 5%인 페니실린일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 상기 배지는 bFGF를 더 포함할 수 있다. 상기 bFGF는 0.0001중량% 내지 0.005중량%로 포함되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에서 상기 배지는 b27을 더 포함할 수 있다. 상기 b27은 0.01중량% 내지 0.5중량%로 포함되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 상기 bFGF 와 b27의 조성비는 1:10 내지 1:1000일 수 있고, 바람직하게는 1:100일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명에서 상기 "b27"은 화학적으로 규명된(defined), 뉴런의 성장에 주로 사용되는 배지 보충제이다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 (c)단계는 상기 모낭세포를 세포외 매트릭스로 코팅한 뒤 제2용기에 부착하여 계대하는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서, "세포외 매트릭스(ECM)"란 조성이 다양한 3차원 분자 복합체로, 성장인자 및 사이토킨 저장소 성질에 기인하여, 형태형성, 증식, 세포 분화 및 조직 회복에 관여한다. 이에 한정하지는 않지만, 예를 들어 상기 매트릭스는 매트릭셀(Matrigel), NuFF 배양보조세포(feeder cell) 및 겔트렉스(Geltrax)에서 선택된 어느 하나 이상인 것이다.
- [0034] 본 발명에서 상기 (b) 및 (d)단계에서 배양하는 기간은 20 내지 40일일 수 있고, 바람직하게는 25 내지 35일일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 일 구현 예에 따르면, 제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 처리한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계; 상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계; 상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및 상기 제2용기에 상기 배지를 처리한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는 탈모의 예방, 완화, 치료용 조성물; 또는 발모 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 상기 세포 배양 방법에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0038] 본 발명에서 용어 "탈모"는 정상적으로 모발이 존재해야 하는 부위에 모발이 결손된 상태를 의미하며, 일반적으로 두피의 성모가 빠지는 것을 의미한다. 성모는 색이 없고 굵기가 가는 연모와는 달리 결손 시 미용상의 문제를 일으킬 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 탈모는 임상적으로 흉터가 형성되는 것과 그렇지 않은 두 종류로 구분될 수 있으며, 흉터가 형성되는 탈모(반흔성)는 모낭이 파괴되므로 모발이 재생되지 않는 반면, 흉터가 형성되지 않는 탈모(비반흔성)는 모낭이 유지되므로 증상 부위가 사라진 후에 모발이 재생된다.
- [0040] 본 발명에서 상기 탈모는 원형 탈모(alopecia areata), 전두 탈모(alopecia totalis), 범발성 탈모(alopecia universalis), 남성형 탈모(androgenic alopecia), 휴지기 탈모(telogen effluvium), 성장기 탈모(anagen effluvium), 또는 화학치료-유발 탈모(chemotherapy-induced alopecia)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 탈모의 예방, 완화, 치료 또는 발모 또는 육모 촉진용 조성물은 약학적 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로도 제공될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 상기 모낭세포 배양액을 포함하는 조성물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 탈모의 예방, 완화, 치료 방법; 또는 발모 또는 육모 촉진 방법에 관한 것이다.

- [0044] 본 발명에서 상기 "개체"란, 탈모, 상처의 예방 또는 치료가 필요한 개체 또는 피부 개선이 필요한 개체로서, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 상기 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 경구 또는 비경구 등의 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 일 구현 예에 따르면, 제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 처리한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계; 상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계; 상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및 상기 제2용기에 상기 배지를 처리한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는 상처의 예방, 치료 또는 완화용 조성물일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 상처 치유 과정에서 중요한 조절자로 알려진 섬유아세포의 형성을 촉진하여(Wnt3a Induces Myofibroblast Differentiation by Upregulating TGF-beta Signaling Through SMAD2 in a beta-Catenin-Dependent Manner. Jon MC, et al. (2011) Plos ONE. 6: e19809) 상처의 예방, 치료 또는 완화 효과를 가질 수 있다(Nilforoushzadeh, Mohammad & Ashtiani, Hamid & Jaffary, Fariba & Jahangiri, Faeze & Nikkhah, Nahid & Mahmoudbeyk, Mona & Fard, Maryam & Ansari, ZibaJaber & Zare, Sona. (2017). Dermal Fibroblast Cells: Biology and Function in Skin Regeneration. Journal of Skin and Stem Cell. In Press. 10.5812/jssc.69080).
- [0049] 본 발명의 상처의 예방, 치료 또는 완화용 조성물은 약학적 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로도 제공될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 구현 예에서 본 발명에 따른 상기 조성물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 상처의 예방, 치료 또는 완화 방법에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 상처의 예방, 치료 또는 완화 방법에서 상기 조성물에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 일 구현 예에 따르면, 제1용기에 ROCK 저해제 및 기저막단백질을 처리한 후, 모낭세포를 상기 제1용기에 부착하는 (a)단계; 상기 제1용기에 배지를 처리한 후 배양하는 (b)단계; 상기 모낭세포를 제2용기에 부착하여 계대하는 (c)단계; 및 상기 제2용기에 상기 배지를 처리한 후 배양하는 (d)단계;에 의해 배양된 모낭세포 배양액을 포함하는 피부 개선용 조성물일 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 용어, "피부 개선"은 피부의 내재적 요인 또는 외인적인 요인에 의하여 유발되는 피부의 손상을 치료, 경감, 완화시키는 과정 또는 그의 효과 등을 포괄적으로 의미하는 것으로, 보다 상세하게는 피부 미백, 주름 개선, 탄력 증진, 피부 재생, 피부 보습, 노화 방지, 피부 자극 완화, 여드름 예방 또는 개선, 및/또는 아토피 예방 또는 개선 효과를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 조성물은 매우 우수한 줄기세포 증식 촉진능을 갖기 때문에 이를 인체에 적용하는 경우 피부에 존재하는 성체 줄기세포의 증식을 촉진하거나 활성화시킴으로써 피부 상태를 개선시킬 수 있다. 피부에 존재하는 성체 줄기세포는 예를 들어, 모낭과 모낭사이의 표피(interfollicular epidermis)의 기저층에 존재하는 줄기세포, 모낭(hair follicle)에 존재하는 줄기세포, 또는 피하 지방층에 존재하는 지방유래 줄기세포이다.
- [0057] 본 발명의 피부 개선용 조성물은 화장품 조성물, 식품 조성물 또는 약학적 조성물로도 제공될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 구현 예에서 본 발명에 따른 상기 조성물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부 개선 방법에 관한 것이다.

- [0060] 본 발명의 상기 모낭세포 배양 방법, 상기 세포, 상기 화장료 조성물 및 상기 약학적 조성물에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0061] 본 발명에 따른 모낭세포 배양액은 상처 부위로 세포가 이동하는 것을 촉진하여 우수한 상처 치료 활성을 갖는다. 또한 섬유아세포의 활성도를 높여 피부 보습, 피부 미백, 주름 개선 및 노화 방지 등의 피부개선 효과가 우수하다. 또한, 본 발명에 따른 모낭세포 배양액은 발모 및 육모 효과가 우수하여 탈모의 방지 및 치료 효과가 뛰어나며, 이를 섭취하거나 피부에 도포하여도 부작용이 없이 안전하다.
- [0063] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 조성물을 이용하여 각종 질환의 증상을 차단하거나, 질환 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 조성물을 이용하여 각종 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용 목욕물 첨가제, 바디로션, 바디밀크, 베스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샴푸, 샴푸크림, 선크림로션, 선크림크림, 선크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 클렌징밀크, 탈모제{화장용}, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누{비의료용}, 크림비누, 페이스 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누, 치아 미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 향산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.
- [0069] 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.
- [0070] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 향산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.
- [0071] 본 발명의 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.
- [0073] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리

사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.

[0074] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0075] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0076] 본 발명에서 모낭세포 배양액을 포함하는 모낭 형성 촉진용 조성물 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 모낭조직을 배양하는 방법을 시간별로 나타낸 것이다.

도 2는 웰에 채취한 모낭조직을 옮긴 것을 나타낸 것이다.

도 3은 모낭조직을 배양하는 각 단계의 사진을 나타낸 것이다.

도 4는 모낭조직 세포를 I matrix 및 Y-27632로 부착하여 배양한 것이다.

도 5는 모낭조직을 Geltrax 및 Y-27632로 부착하여 배양한 것이다.

도 6은 모낭조직 세포가 웰에서 부유하고 있는 것을 나타낸 것이다.

도 7은 모낭조직에서 줄기세포를 확인한 것이다.

도 8은 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리하여 이동능을 측정한 것을 나타낸 것이다.

도 9는 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 콜라겐 유전자 발현량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 ELN 유전자 발현량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 KGF 유전자 발현량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 섬유아세포의 양을 계산한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 진피유두세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 FGF-10 유전자 발현량을 그래프로 나타낸 것이다.

도 14는 진피유두세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 FGF-7 및 vEGF 유전자 발현량을 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[준비예 1] 모낭세포의 배양

[1-1] 모낭세포의 배양(1)

[0082] 도 1 및 도 3에 따라 제조예 1의 모낭세포를 배양하였다. 도 2 및 도 4와 같이, 모낭조직을 6 웰 플레이트에 돌배코 변형 이글베지(Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM) + Y-27632 (10 μ M) + I-매트릭스(재조합 라미닌

E8 프래그먼트) (5 μ l/2ml) + 1% 페니실린에 첨가하여 부착시킨 후 세포 배양기에 넣어두었다. 약 30일간 배지 변경 없이 배지가 부족할 때 적당량 채워주었다.

[0083] 30일 후 전체 모발(Whole-hair)을 포함한 모든 세포를 계대하는데, 이때는 도 5와 같이 겔트랙스(Geltrax)로 코팅을 한 뒤 Y-27632 (10 μ M)을 넣고 세포를 부착시켰다. 이후에도 30일마다 겔트랙스로 코팅한후 Y-27632 (10 μ M)을 첨가하고 세포를 부착시켜 배양했다. 배지는 돌배코 변형 이글배지(Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM) (5 μ l/2ml) + 1% 페니실린 + 10% FBS를 사용하였고, 배지가 부족할 때 적당량 채워주었다.

[0085] [1-2] 모낭세포의 배양(2)

[0086] 모낭세포 배양액을 수득하기 위하여, 제조예 2 내지 4의 모낭세포를 배양하였다. 모낭세포를 6 웰 플레이트에 돌배코 변형 이글배지(Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM) + Y-27632 (10 μ M) + I-매트릭스(재조합 라미닌 E8 프래그먼트) (5 μ l/2ml) + 1% 페니실린에 첨가하여 부착시킨 후 세포 배양기에 넣어두었다. 이후 약 30일간 배지가 부족할 때 적당량 채워주었다. 이때 사용된 배지의 조성비는 하기 표 1과 같다.

표 1

성분	제조예 2	제조예 3	제조예 4
Y-27632	10 μ M	10 μ M	10 μ M
bFGF	0.0002중량%	0.001중량%	0.002중량%
b27	0.02중량%	0.1중량%	0.2중량%
DMEMF/12+페니실린+MSCM+FBS	잔부	잔부	잔부

[0089] 30일 후 전체 모발(Whole-hair)을 포함한 모든 세포를 계대하는데, 이때는 도 5와 같이 겔트랙스(Geltrax)로 코팅을 한 뒤 Y-27632 (10 μ M)을 넣고 세포를 부착시켰다. 이후에도 30일마다 겔트랙스로 코팅한후 Y-27632 (10 μ M)을 첨가하고 세포를 부착시켜 배양했다. 마찬가지로 배지는 상기 표 1의 배지가 부족할 때 적당량 채워주었다.

[0091] [1-3] 모낭세포의 배양(3)

[0092] 모낭세포 배양액을 수득하기 위하여, 비교예 1 내지 3의 모낭세포를 배양하였다. 모낭세포를 6 웰 플레이트에 돌배코 변형 이글배지(Dulbecco Modified Eagle Medium; DMEM) + I-매트릭스(재조합 라미닌 E8 프래그먼트) (5 μ l/2ml) + 1% 페니실린에 첨가하여 부착시킨 후 세포 배양기에 넣어두었다. 이후 약 30일간 배지가 부족할 때 적당량 채워주었다. 이때 사용된 배지의 조성비는 하기 표 2와 같다.

표 2

성분	비교예 1	비교예 2	비교예 3
bFGF	0.0002중량%	0.001중량%	0.002중량%
b27	0.02중량%	0.1중량%	0.2중량%
DMEMF/12+페니실린+MSCM+FBS	잔부	잔부	잔부

[0095] 상기 표 2에서와 같이, 비교예 1의 배양액은 제조예 2의 배양액에서 Y-27632를 제외하고는 동일한 농도를 가지는 배양액이고, 비교예 2의 배양액은 제조예 3의 배양액에서 Y-27632를 제외하고는 동일한 농도를 가지는 배양액이며, 비교예 3의 배양액은 제조예 4의 배양액에서 Y-27632를 제외하고는 동일한 농도를 가지는 배양액에 해당한다.

[0096] 30일 후 전체 모발(Whole-hair)을 포함한 모든 세포를 계대하는데, 이때는 도 5와 같이 겔트랙스(Geltrax)로 코팅을 한 뒤 세포를 부착시켰다. 이후에도 30일마다 겔트랙스로 코팅한후 세포를 부착시켜 배양했다. 마찬가지로 배지는 상기 표 2의 배지가 부족할 때 적당량 채워주었다.

- [0098] [1-4] 모낭세포의 배양(4)
- [0099] 모낭조직에 코팅을 하지 않고 제조예 1과 같은 성분의 배지만 첨가하여 배양하였다. 그 결과, 도 6과 같이 모낭 조직의 모낭세포가 부유하여 계대 과정에서 지속적으로 세포를 잃어 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0101] [1-5] 모낭줄기세포의 확인
- [0102] 제조예 1의 모낭조직에서 상기 모간을 제거한 것에 도 7과 같이 미분화줄기세포마커인 OCT4 항체를 이용하여 세포의 핵(파란색)과 OCT4(빨강색)를 염색한 결과, 제조예 1의 모낭세포 배양배지에 모낭줄기세포가 존재함을 확인하였다
- [0104] [준비예 2] 모낭세포 배양액의 분리
- [0105] 준비예 1의 과정으로 배양된 모낭세포를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 여과하여 모낭세포 배양액을 추출하였다. 구체적으로는 먼저 세포를 트립신 EDTA로 떼어낸후 3000RPM에서 5분동안 원심분리하였다. 다음으로 상층액만 걸어서 다시 3000RPM에서 5분동안 원심분리하였다. 다음으로 상층액만 걸어서 0.22 μ M 크기의 필터시스템을 이용하여 세포를 포함한 이물질을 제거하였다.
- [0107] [실험예 1] 모낭세포 배양액의 효과 확인(1)
- [0108] [1-1] 섬유아세포에 모낭세포 배양액을 처리한 경우 이동능 비교
- [0109] 제조예 1의 모낭세포 배양액(Follicle로 표시)이 포함된 조성물의 효능을 확인하는 실험을 실시하였다. 도 8과 같이, 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물과 대조군을 처리하여, 섬유아세포 이동능을 확인하였다. 도 8의 점선은 섬유아세포가 이동하기 전을 표시한 것이고, 도 8의 상단 사진들은 섬유아세포에 배양액을 처리하여 이동하기 전을 촬영한 것이며, 도 8의 하단 사진들은 섬유아세포에 배양액을 처리한 후 48시간이 지난 후를 촬영한 것이다. 도 8과 같이 조성물을 처리하지 않은 대조군(CTRL)에 비하여 EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물을 처리하였을 때 섬유아세포가 눈에 띄게 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 EGF의 농도는 200ng/ml, 상기 FGF4의 농도는 100ng/ml로 하였다.
- [0111] [1-2] 섬유아세포에 모낭세포 배양액을 처리한 경우 유전자 발현 비교
- [0112] 제조예 1의 모낭세포 배양액(Follicle media로 표시)이 포함된 조성물의 효능을 확인하기 위해 섬유아세포에 모낭세포 배양액 조성물을 처리하는 실험을 실시하였다. 도 9는 섬유아세포에 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 콜라겐 유전자 발현량을 그래프로 나타낸 것으로 EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물을 처리한 경우, 대조군에 비해 콜라겐 유전자인 COLA1 및 COLA2의 발현량이 증가하였다.
- [0113] 도 10은 섬유아세포에 EGF+FGF4와 EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물을 각각 처리한 경우, 엘라스틴 프로틴 유전자(ELN)의 발현량을 나타낸 것으로, EGF+FGF4에 비해 EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물에서 ELN의 발현이 증가하였다.
- [0114] 도 11은 섬유아세포에 EGF, FGF4, EGF+FGF4, EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물을 각각 처리한 경우, 각질세포 성장 인자(Keratinocyte Growth Factor; KGF)의 발현량을 나타낸 결과로, KGF 유전자의 발현량은 EGF+FGF4+모낭세포 배양액 성분의 배양액, EGF+FGF4, FGF4, EGF 순으로 발현량이 높았다. 이때, EGF의 농도는 200ng/ml, FGF4의 농도는 100ng/ml로 처리하였다.
- [0115] 도 12는 모낭세포 배양액이 포함된 조성물을 처리한 경우 섬유아세포의 증식량을 나타낸 것이다. 5만개의 섬유아세포를 파종(seeding)하여 7일 후의 세포양을 계산한 결과, 도 12와 같이 대조군은 변화가 없었으며, EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물, EGF+FGF4, EGF, FGF4 순으로 세포가 증가하였다. 이때, EGF의 농도는 200ng/ml, FGF4의 농도는 100ng/ml로 처리하였다.

[0117] 상기와 같이, 본 발명에 따라 EGF+FGF4+모낭세포 배양액 조성물을 처리하는 경우 EGF, FGF4를 단독으로 처리한 경우보다 모낭형성에 필요한 유전자 발현 및 세포의 이동 및 증식이 활성화되는 것을 확인하였다.

[0119] **[실험예 2] 모낭세포 배양액의 효과 확인(2)**

[0120] **[2-1] 모낭세포 배양액에 따른 세포 활성화 효과 비교(1)**

[0121] 모낭세포를 배양할 때 모낭세포 배양액에 Y-27632이 포함되었는지 여부에 따라 세포 활성화 효과의 차이가 있는지 여부를 판단하기 위하여 FGF-10 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로는, 제조예 2 내지 4에 의해 제조된 모낭세포 배양액과 비교예 1 내지 3에 의해 제조된 모낭세포 배양액을 진피유두세포에 처리한 경우 FGF-10 관련 mRNA 발현량을 비교하여 도 13에 나타내었다.

[0122] 도 13에 나타난 것처럼, 제조예 2 내지 4에 의해 제조된 모낭세포 배양액의 경우 비교예 1 내지 3에 의해 제조된 모낭세포 배양액에 비하여 FGF-10 관련 mRNA의 발현량이 현저히 높은 것을 확인한 바, 모낭세포를 배양할 때 모낭세포 배양액에 Y-27632이 포함된 경우, 모낭세포 배양액의 세포 활성화 효과가 현저한 것을 확인하였다.

[0124] **[2-2] 모낭세포 배양액에 따른 세포 활성화 효과 비교(2)**

[0125] 모낭세포를 배양할 때 모낭세포 배양액에 Y-27632이 포함되었는지 여부에 따라 세포 활성화 효과의 차이가 있는지 여부를 판단하기 위하여 FGF-7 및 vEGF 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로는, 제조예 4에 의해 제조된 모낭세포 배양액과 비교예 3에 의해 제조된 모낭세포 배양액을 진피유두세포에 처리한 경우 FGF-7 및 vEGF 관련 mRNA 발현량을 비교하여 도 14에 나타내었다.

[0126] 도 14에 나타난 것처럼, 제조예 4에 의해 제조된 모낭세포 배양액의 경우 비교예 3에 의해 제조된 모낭세포 배양액에 비하여 FGF-7 및 vEGF 관련 mRNA의 발현량이 현저한 것을 확인한 바, 모낭세포를 배양할 때 모낭세포 배양액에 Y-27632이 포함된 경우, 모낭세포 배양액의 세포 활성화 효과가 현저히 높은 것을 확인하였다.

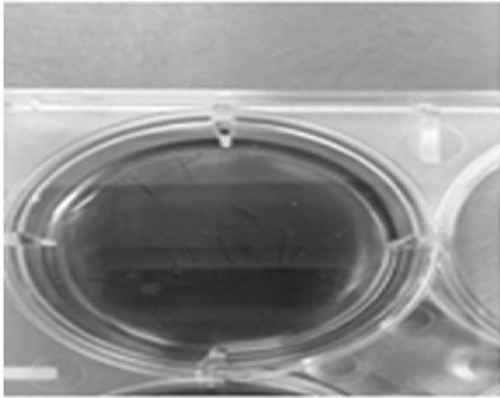
[0128] 이상에서 본 발명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

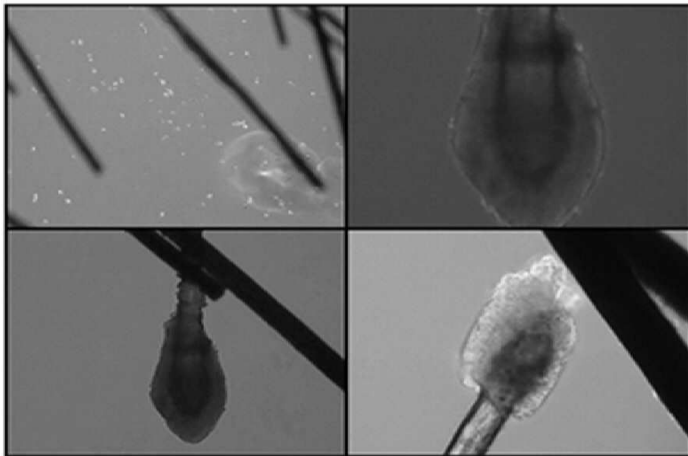
도면1



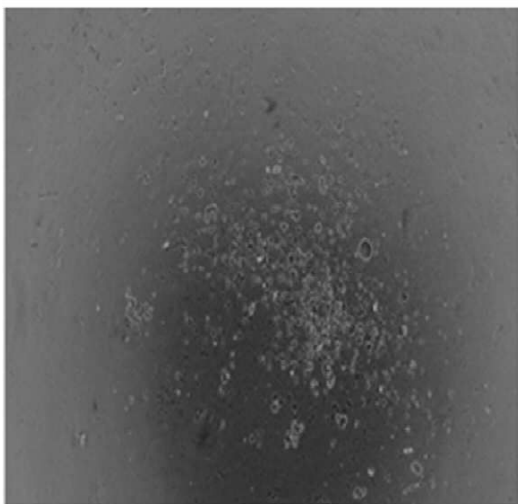
도면2



도면3

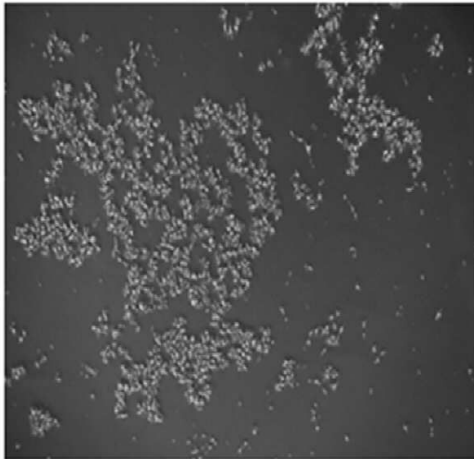


도면4



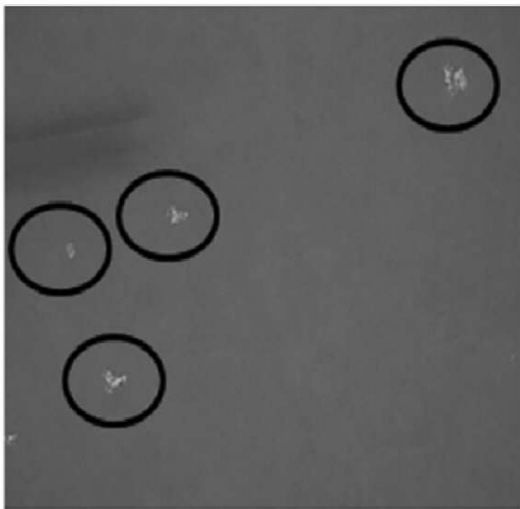
Y-27632+I-Matrix

도면5



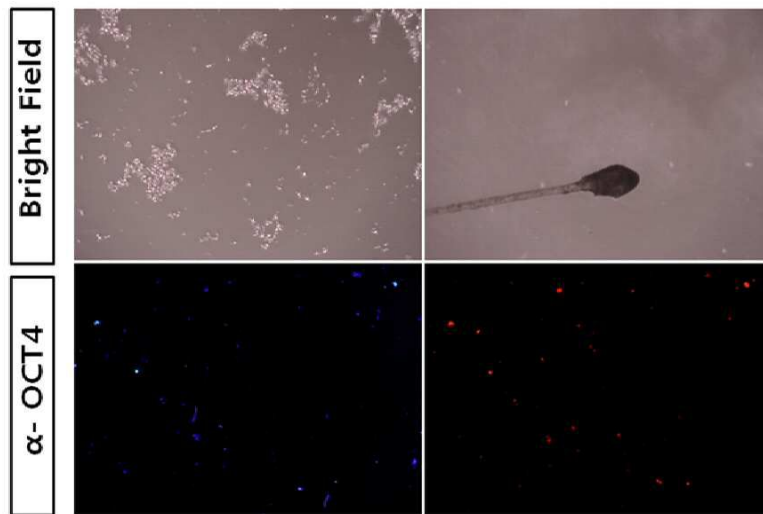
Geltrax coating

도면6

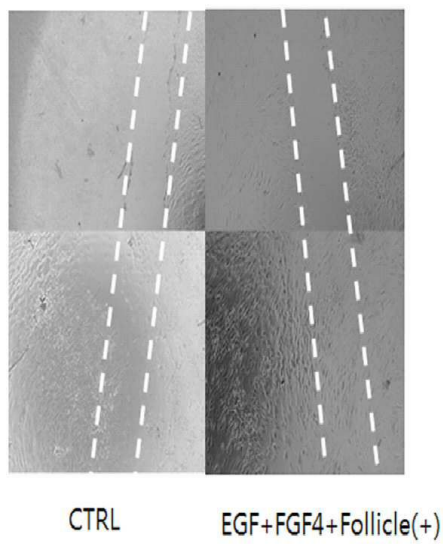


suspension

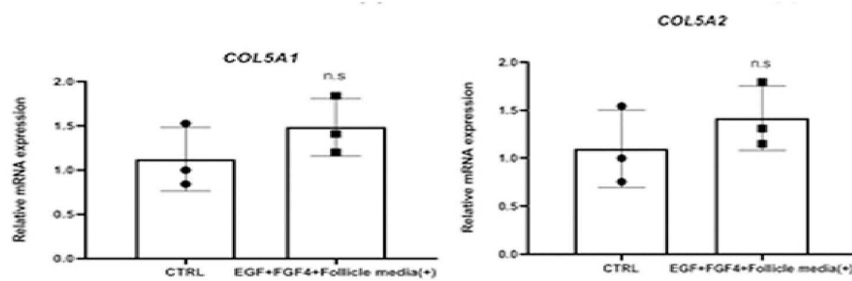
도면7



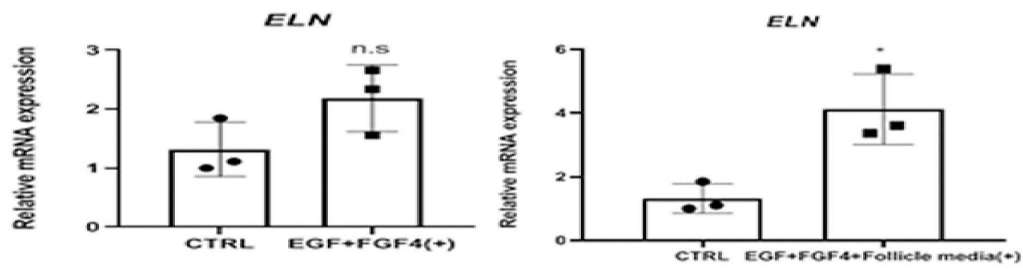
도면8



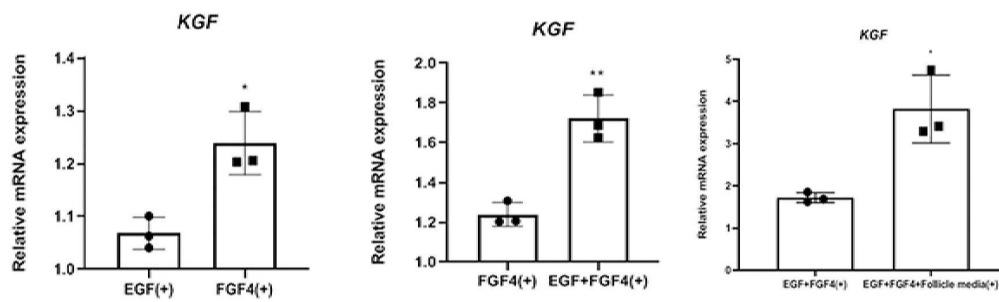
도면9



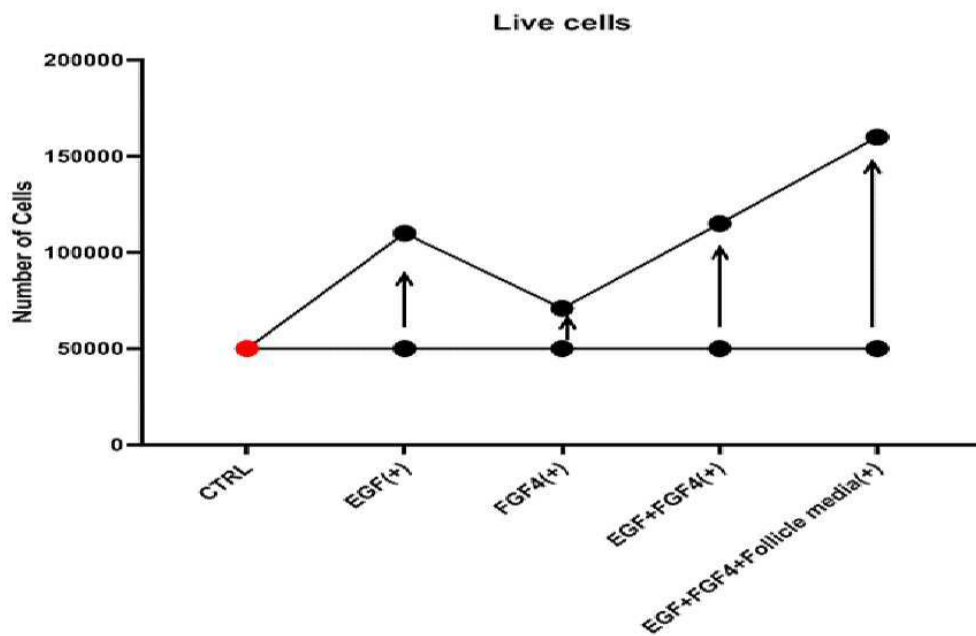
도면10



도면11

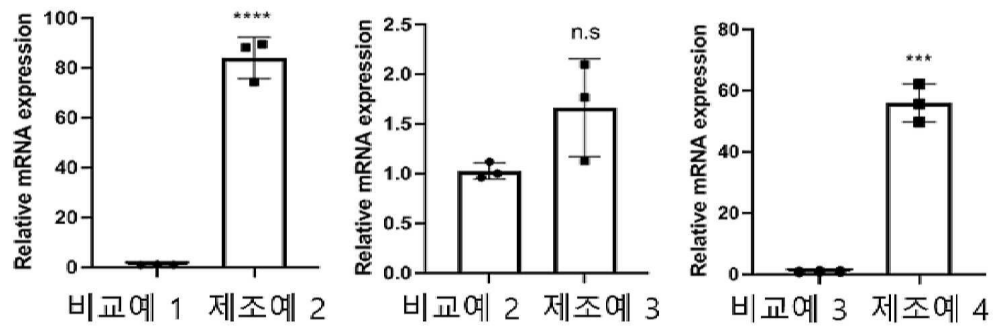


도면12



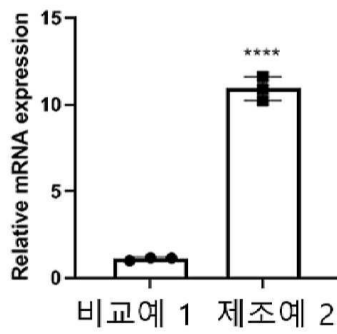
도면13

FGF-10



도면14

FGF-7



vEGF

