



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월23일

(11) 등록번호 10-2218833

(24) 등록일자 2021년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0775 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01) A61K 8/98 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01) A61Q 7/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0667 (2013.01)

A61K 35/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0164116

(22) 출원일자 2019년12월10일

심사청구일자 2019년12월10일

(65) 공개번호 10-2020-0071043

(43) 공개일자 2020년06월18일

(30) 우선권주장

1020180158063 2018년12월10일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

The Journal of Clinical Investigation,

vol.127(9). pp.3353~3366(2017)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

성종혁

경기도 성남시 분당구 서판교로 73, 1005동 102호
(판교동, 판교원마을10단지아파트)

최나현

인천광역시 연수구 원인제로 180, 202동 801호(연수동, 연수우성2차아파트)

(74) 대리인

특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 3 항

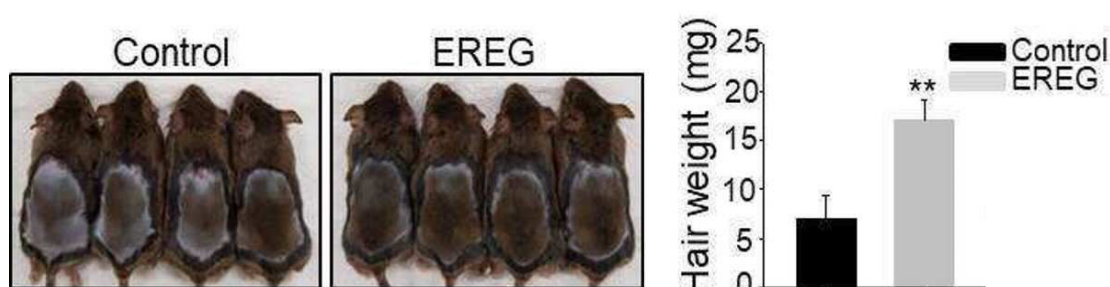
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 에피레굴린 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 에피레굴린 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 에피레굴린 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물, 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



한 것이다.

본 발명에 따른 에피레굴린 또는 이의 단편에 의해 모근의 텔로겐(telogen)에서 모발성장 유도가 촉진될 뿐만 아니라, 마우스에서 탈모 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 에피레굴린 또는 이의 단편은 탈모 방지 또는 탈모 촉진을 위한 용도로 용이하게 활용될 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포는 증식능, 이동능이 향상되고 노화가 억제되어, 탈모 치료제 또는 탈모 예방 또는 개선용 화장품으로 유용하다. 본 발명에 따르면, 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포는 증식능 및 이동능이 현저하게 증가하고, 노화가 현저하게 억제되었으며, 이를 동물 모델에 투여하였을 때 대조군에 비해 성장기 모발 유도 및 탈모 효과의 현저한 증가가 확인되었다.

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)

A61K 38/1808 (2013.01)

A61K 8/64 (2013.01)

A61K 8/981 (2013.01)

A61P 17/14 (2018.01)

A61Q 7/00 (2019.01)

C12N 2501/11 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

에피레굴린(Epiregulin; EPR) 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피레굴린 유래 단편을 포함하며, 상기 에피레굴린 또는 에피레굴린 유래 단편에 의해 모유두 세포의 증식 촉진 및 모발유도능력이 증가하여 발모가 유도되는 것을 특징으로 하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

에피레굴린(Epiregulin; EPR) 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피레굴린 유래 단편을 포함하며, 상기 에피레굴린 또는 에피레굴린 유래 단편에 의해 모유두 세포의 증식 촉진 및 모발유도능력이 증가하여 발모가 유도되는 것을 특징으로 하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 의약품 조성물.

청구항 4

에피레굴린(Epiregulin; EPR) 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 에피레굴린 유래 단편을 포함하며, 상기 에피레굴린 또는 에피레굴린 유래 단편에 의해 모유두 세포의 증식 촉진 및 모발유도능력이 증가하여 발모가 유도되는 것을 특징으로 하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장품 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에피레굴린 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 에피레굴린 또는 이의 단편을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물, 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 미용에 관한 관심이 높아지면서 탈모증의 치료에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 탈모증이란, 정상적으로

모발이 있어야 할 곳에 모발이 없는 상태를 말한다. 모발은 생명에 직접 관계되는 중요한 생리적 기능은 없지만 미용적인 관점에서 역할이 매우 크며 이외에도 자외선 차단, 머리 보호 등의 기능이 있다. 탈모가 심한 경우 사회생활을 하는데 문제가 있을 수 있으며, 심리적으로도 심각한 영향을 미칠 수 있어서 삶의 질 측면에서 중요하다.

- [0004] 탈모는 임상적으로 상처가 동반되는 반흔성 탈모와 모발만 빠지는 비반흔성 탈모로 나뉠 수 있다. 반흔성 탈모의 경우, 모낭이 파괴되므로 모발이 다시 나지 않는다. 모발은 모낭이라고 하는 곳에서 만들어지며 각 모낭은 주기적으로 활동과 정지의 단계를 거치게 된다. 이러한 모발 주기의 시간적 간격은 신체 부위에 따라 다양한데 머리털의 경우에는 2 ~ 6년 정도의 성장기(anagen)와 2~4주 간의 퇴행기(catagen)를 거쳐서 3 ~ 4개월 정도의 휴지기(telogen)에 들어가게 된다. 각 모낭은 일생 동안 10 ~ 20회의 모낭 성장 주기(hair follicle growth cycle)를 갖게 된다.
- [0005] 탈모 치료법으로 현재 가장 많이 쓰이고 있는 수술 방법은 자가모발이식이며, 프로페시아 및 미녹시딜을 사용하는 약물치료가 널리 시술되고 있다. 약물치료의 경우, 투여할 당시에는 발모 효능이 나타나지만 치료가 중단되면 탈모가 다시 진행되며, 특히 미녹시딜의 경우, 성기능 장애 등의 부작용이 있다.
- [0007] 한편, 에피레굴린(Epiregulin; EPR)은 인간에서 EREG 유전자에 의해 암호화 되는 단백질로, 에피레굴린은 표피 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)의 리간드로 알려져 있으나, 모발 성장과 관련된 내용은 공지된바 없다.
- [0008] 또한, 줄기세포를 이용한 탈모치료 방법이 최근 각광받고 있으며, 최근 연구에서 저산소 상태 또는 비타민 C를 전처리한 지방줄기세포에 의해 모발 주기가 휴지기(telogen)인 마우스가 성장기(anagen)로 전환되는 것을 확인하였으며(Won *et al.*, *J Dermatol Sci* 57:134-137, 2010; Kim *et al.*, *Stem Cells Dev* 23:1364-1376, 2014), 이는 지방줄기세포의 모발 재생능 향상에 의한 것임을 알 수 있다. 또한, 지방줄기세포에서 발현되어 분비된 성장인자 PDGF-A는 모낭줄기세포의 활성을 조절하고 모발주기에서 성장기(anagen)를 유도한다는 것이 알려져 있다(Festa *et al.*, *Cell* 146:761-771, 2011, Tomita *et al.*, *J Dermatol Sci* 43:105-115, 2006). 그러나 지방줄기세포에서 에피레굴린의 기능 및 효과는 확인된 바가 없다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 지방줄기세포의 생산 수율 향상 및 발모 효과 증대를 위한 방법을 개발하기 위해 예의 연구한 끝에 에피레굴린 또는 이의 단편에 의해 모발 성장 유도가 촉진되는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 에피레굴린에 의해 지방줄기세포의 증식, 이동이 증가하고, 노화가 억제되며 에피레굴린 처리된 지방줄기세포의 모발 재생능이 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 에피레굴린 또는 이의 단편을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 지방줄기세포의 발모 유도능을 강화시킬 수 있는 증식방법을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 발모 유도능이 강화된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물 또는 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 지방줄기세포의 증식능, 이동능, 노화 억제능을 강화시킬 수 있는 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상술한 목적을 달성하기 위해,
- [0018] 본 발명은 에피레굴린(Epiregulin; EPR) 또는 이의 단편을 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 있어서, 상기 에피레굴린 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 화장품

조성물일 수 있다.

- [0022] 본 발명은 또한, 에피레굴린이 첨가된 배지에서 지방 유래의 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 지방줄기세포의 발모 유도능을 강화시킬 수 있는 증식 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한, 에피레굴린을 처리하여 배양된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 또한, 에피레굴린을 유효성분으로 함유하는 지방줄기세포의 증식 또는 이동 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 또한, 에피레굴린을 유효성분으로 함유하는 지방줄기세포의 노화 억제용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또한, 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명은 또한, 에피레굴린을 처리하여 배양된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 에피레굴린 또는 이의 단편에 의해 모근의 텔로겐(telogen)에서 모발성장 유도가 촉진될 뿐만 아니라, 마우스에서 발모 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 에피레굴린 또는 이의 단편은 탈모 방지 또는 발모 촉진을 위한 용도로 용이하게 활용될 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명에 따른 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포는 증식능, 이동능이 향상되고 노화가 억제되어, 탈모 치료제 또는 탈모 예방 또는 개선용 화장품으로 유용하다.
- [0032] 본 발명에 따른 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포는 배양시 증식능이 현저하게 증가하여 배양 기간이 획기적으로 줄어든다는 장점이 있다.
- [0033] 본 발명에 따르면, 에피레굴린으로 처리된 지방줄기세포는 증식능 및 이동능이 현저하게 증가하고, 노화가 현저하게 억제되었으며, 이를 동물 모델에 투여하였을 때 대조군에 비해 성장기 모발 유도 및 발모 효과의 현저한 증가가 확인되었다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 실험동물에서 에피레굴린의 발모 효과를 확인한 도면이다.
- 도 2는 에피레굴린을 처리하여 생쥐의 성장기 콧수염 길이 증가를 확인한 도면이다.
- 도 3은 모유두 세포(hDPC)에 에피레굴린을 처리 및 배양한 후 trypan blue로 염색 및 직접 카운트하여 세포 증식 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 실험동물에서 에피레굴린 단편의 발모 효과(A) 및 모유두 세포의 증식 정도를 확인한(B) 도면이다.
- 도 5는 에피레굴린 처리에 따른 지방줄기세포의 증식능 향상 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 에피레굴린 처리에 따른 지방줄기세포의 이동능 향상 효과를 스크래치 분석을 통해 나타낸 것이다.
- 도 7은 에피레굴린 처리에 따른 지방줄기세포의 이동능 향상 효과를 트랜스웰(transwell)을 이용하여 나타낸 것이다.
- 도 8은 에피레굴린 처리에 따른 지방줄기세포의 재생능력 향상 효과를 콜로니 형성능 분석(clonogenic assay)을 통해 나타낸 것이다.
- 도 9는 에피레굴린 처리에 따른 지방줄기세포의 노화 억제 효과를 베타 갈락토시데이즈(beta-galactocidase)염색을 통해 나타낸 것이다.
- 도 10은 실험동물에서 에피레굴린 전 처리된 지방줄기세포의 발모 효과를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0038] 본 발명은 일관점에서, 에피레굴린(Epiregulin; EPR) 또는 이의 단편을 포함하는 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 상기 에피레굴린은 표피성장인자(Epidermal Growth Factor)의 패밀리로 피부세포의 분화와 성장에 중요한 역할을 한다. 에피레굴린 단편은 GQCIYLSGDR(서열번호 1)을 포함할 수 있으며, 탈모 방지 또는 발모 촉진 효능을 증가시키기 위해, 필요에 따라 아미노산 서열을 변형시켜 적용할 수 있다. 변형된 에피레굴린 단편은 바람직하게 GQCIYLNNNNN(서열번호 2)를 포함할 수 있으나, 상기 아미노산 서열과 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 "탈모"는 모발이 완전히 두피 밖으로 빠져나오는 현상으로서, 남성형 탈모, 여성형 탈모를 예방 또는 치료할 수 있으며, 모낭 손상으로 인해 유발되는 남성형 탈모의 예방 또는 치료에 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 용어 "발모"는 두피에서 모발이 나는 것을 의미하고, 구체적으로 탈모된 부위 또는 털이 없는 부위(무모 부위)에 모낭을 형성하여 털이 나도록 유도하는 것을 의미한다. 이는 당업계에서 모발의 길이가 길어지는 것(즉, 모발 성장)을 의미하는 "육모" 또는 "양모"와 동일한 의미로 사용된다.
- [0042] 본 발명의 실시시예에서는, 털이 제거된 마우스의 등 부위에 에피레굴린을 처리하여 모발 생성 효과를 확인하여 본 결과, 에피레굴린을 처리한 그룹이 대조군에 비하여 모발이 더 빠르고 풍부하게 생성되어 더 우수한 모발 증식 효과가 있음을 알 수 있었다(도 1). 또한, 에피레굴린을 처리하여 조직 배양한 결과, 에피레굴린을 처리한 배양액에서 마우스 콧수염의 길이가 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 2). 나아가, 에피레굴린을 모유두 세포에 처리하여 배양하였을 때, 에피레굴린을 처리한 배양액에서 모유두 세포의 증식능력이 월등하게 향상되는 것을 확인하였다(도 3).
- [0043] 본 발명의 다른 실시예에서, 에피레굴린 단편을 제모한 마우스 등에 주입한 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이, 에피레굴린을 처리한 쥐에서 모발 성장기 유도가 빨라졌음을 알 수 있었다.
- [0044] 또한, 에피레굴린 단편에 의한 모유두 세포의 증식 효과를 확인한 결과, 도 4B에 나타난 바와 같이, 모유두 세포의 증식이 농도 의존적으로 현저하게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 에피레굴린(Epiregulin; EPR) 또는 이의 단편은 모발의 성장을 효과적으로 유도하는 것을 확인하였으므로, 탈모 방지 또는 발모 촉진을 위한 용도로 용이하게 활용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 화장품 조성물로 제조될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물을 포함하는 의약조성물, 의약품 조성물 또는 화장품 조성물이어 적용될 수 있는 부위는 두피뿐만 아니라 발모를 필요로 하는 신체 부위라면 어디나 적용할 수 있다. 예를 들면, 외상으로 인한 흉터로 모발 또는 털이 손상된 부위 또는 단순 미용효과를 목적으로 하는 넓은 이마 또는 M형 이마, 속눈썹 또는 눈썹 및 무모증의 상태 호전에도 사용할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조될 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람

직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.

- [0051] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물이 의약품 조성물로 제조될 경우, 탈모 방지 또는 발모 촉진 효과를 나타내는 상기 지방유래 줄기세포를 그대로 첨가하거나, 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 탈모 방지 또는 발모 촉진용 의약품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정하지 않으며, 탈모 방지 또는 발모 촉진 효과를 나타내는 것으로 당업계에 공지된 의약품의 형태로 다양하게 제형화될 수 있다. 상기 제형화된 의약품은 헤어토닉, 헤어로션, 헤어크림, 헤어스프레이, 헤어무스, 헤어젤, 헤어컨디셔너, 헤어샴푸, 헤어 린스, 헤어팩, 헤어트리트먼트, 눈썹발모제, 속눈썹발모제, 속눈썹영양제, 애완동물용 샴푸, 애완동물용 린스, 손 세정제, 세제비누, 비누, 소독정결제, 물티슈, 마스크, 연고제, 패치 또는 필터 충전제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 의약외품을 모두 포함한다.
- [0055] 또한, 각 제형에 있어서 탈모 방지 또는 발모 촉진용 의약품 조성물은 다른 성분들을 기타 의약품의 제형 또는 사용목적 등에 따라 임의로 선정하여 배합할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용목적에 따라 적합하게 결정될 수 있고, 예를 들면 점증제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 및 담체 등을 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조될 경우, 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 상기 지방유래 줄기세포 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0058] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0062] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 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, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0065] 본 발명은 다른 관점에서, 지방줄기세포 배양 배지에 에피레굴린을 처리하여 배양하는 단계;를 포함하는, 지방줄기세포의 발모 유도능을 강화시킬 수 있는 증식 방법에 관한 것이다.

- [0066] 본 발명의 배양 배지에 함유되는 에피레굴린은 상기한 바와 같이 5 ~ 50 ng/ml의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 배양 단계는 에피레굴린을 포함하는 배지에 지방줄기세포를 접종하고 48 내지 72시간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양과정은 당업자라면 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 이러한 다양한 배양 방법은 다양한 문헌(예를 들면, James et al., *Biochemical Engineering*, Prentice-Hall International Editions)에 개시되어 있다. 세포의 성장방식에 따라 현탁배양과 부착배양을 배양방법에 따라 회분식과 유가식 및 연속배양식의 방법으로 구분된다.
- [0069] 배양에 사용되는 배지는 지방 줄기세포의 배양 요구조건을 적절하게 만족시켜야 한다. 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원, 미량원소 성분 및 성장인자 등을 포함한다. 사용될 수 있는 탄소원의 예로는, 포도당, 자당, 유당, 과당(fructose), 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 탄소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원의 예로는, 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아추출물, 옥수수 침지액(CSL), 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원이 포함된다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는, 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 그 외에, 아미노산 및 적절한 전구체 등이 포함될 수 있다. 배양 중에 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 적절한 방식으로 첨가하여, pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에는 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 바람직하게 본 발명에서 배양 배지는 동물세포 배양 기술분야에서 통상적으로 사용되는 배지를 사용할 수 있으며, 상업적으로 입수 가능한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), DMEM-F12(mix of DMEM and Ham's F-12 medium), MEM(Minimum Essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), α -MEM(MEM Alpha Modification), RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640), M199/F12(Medium 199 and Ham's F-12 medium), IMEM(Improved MEM), MCDB 131 배지 등을 사용할 수 있으며, 상기 배지를 기본으로 사용하여 상기한 바와 같이 에피레굴린 또는 HB-EG를 추가로 첨가한 것을 사용할 수 있다. 아울러, 필요시 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이나 성장인자 또는 분화 관련 인자를 추가로 포함할 수 있으며, 줄기세포 배양을 위해 통상적으로 사용되는 항생제, 예를 들어, 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 카나마이신(kanamycin), 암피실린(ampicillin) 또는 암포테리신 B(amphotericin B) 등과 같은 항생제를 단독으로 또는 혼합하여 첨가할 수 있다. 배양시에는 통상의 동물세포의 배양 조건에서와 같이 일정농도(예를 들어 5%)의 CO₂를 유지시킬 수 있다. 배양시의 온도는 보통 20 ℃ 내지 45 ℃바람직하게는 25 ℃내지 40 ℃를 유지할 수 있다.
- [0070] 배양 종료 후에 배양액과 지방 줄기세포를 분리하기 위해 원심분리(centrifugation) 또는 여과(filtration)과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자가 필요에 따라 수행할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일실시예에서는 에피레굴린에 의한 지방줄기세포의 활성화를 확인하기 위하여 에피레굴린 처리 후 지방줄기세포의 증식 및 이동(migration)이 증가되는 것을 확인하였다 (도 5 내지 도 7).
- [0073] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 에피레굴린 처리한 지방줄기세포의 재생능력 및 노화억제능력을 확인하였다 (도 8 및 도 9)
- [0074] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 털이 제거된 마우스의 등 부위에 에피레굴린으로 처리한 지방줄기세포를 이식하여 모발 생성 효과를 확인하였다. 그 결과, 에피레굴린으로 활성화된 지방줄기세포를 이식한 그룹이 대조군에 비하여 모발이 더 빠르고 풍부하게 생성되어 더 우수한 모발 증식 효과가 있음을 알 수 있었다 (도 10).
- [0076] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 에피레굴린을 처리하여 배양된 지방줄기세포, 또는 그 배양액을 유효성분으로 포함하는, 탈모증 예방, 치료 또는 발모 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0077] 상기 약학적 조성물은 세포 이식 용도로 사용될 수 있다.
- [0078] 본 발명은 또 다른 관점에서, 에피레굴린 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 개선용 의약품 조성물에 관한 것이다.
- [0079] 본 발명은 또 다른 관점에서, 에피레굴린 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모

예방 또는 발모 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

[0080] 약학적 조성물, 의약외품 조성물 및 화장품 조성물에 관한 내용은 상기 기재한 내용이 동일하게 적용될 수 있다.

[0082] 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0084] **에피레굴린의 발모 효과 확인**

[0085] 애완동물용 털 제모기와 제모크림을 사용해서 6주령 male C3H 쥐의 등 부분의 털을 제거한 후 100 ng/ml의 에피레굴린(페프로텍, Cat No.100-04)을 100 μ l씩 쥐 등에 12일 동안 피하주사 하였다. 16일째 되는 날 면도칼을 사용하여 쥐 등에 새로 자란 털을 밀고 무게 측정을 통해서 털 재생하는 정도를 살펴보았다.

[0086] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 에피레굴린을 처리한 쥐에서 모발 성장기 유도가 빨라졌음을 알 수 있었다.

실시예 2

[0088] **에피레굴린 처리된 배지에서 조직 배양의 효과 확인**

[0089] 정상적인 생쥐의 성장기 콧수염(anagen vibrissal)을 메스와 족집게를 사용하여 분리하였다. 분리된 생쥐의 콧수염을 정량 배지(2 mM L- 글루타민, 10 μ g /ml 인슐린, 10 ng / ml 하이드로 코르티손, 페니실린과 혈청이 없는 윌리엄스 E 배지)에 에피레굴린을 5~20 ng 처리하여 배양 하였다. 배양 시작 72 시간 후 개별 모낭을 촬영 하였다(Edmund Optics Ltd, UK). 모발 길이의 변화를 사진으로부터 계산하고, 8~10 개의 모발 모낭의 평균 \pm SE로 나타내었다.

[0090] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 대조군 보다 에피레굴린을 처리한 군에서, 분리된 생쥐의 콧수염의 길이가 증가하였다.

실시예 3

[0092] **에피레굴린 처리에 의한 모유두 세포의 증식 효과 확인**

[0093] 인간 유래의 모유두 세포(Human dermal papilla cell, hDPC)를 1% 안티바이오틱(Antibiotic) 및 안티마이코틱(Antimycotic) Hyclone sv30079.91을 포함하는 Follicle Dermal Papilla cell Growth media (Promocell, Heidelberg, Germany) 배지에 접종하고, 37℃의 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하여 세포를 준비하였다. 12-well에다가 준비한 hDPC를 5×10^3 /well 농도로 배양 배지에 접종하였다. 하룻밤 동안 배양한 후, 5 ~ 20 ng의 에피레굴린을 처리하여 48 시간 동안 추가 배양하였다. 그런 다음, 트립신 500 μ l를 넣고 각 well에 세포를 띄운 후 동량의 배지를 첨가하여 중화 시킨 후 세포가 섞인 배지를 1.5ml tube에 모은다. 여기서 50 μ l만 취하여 트리판블루 50 μ l 넣고 염색 한 후 공식을 이용하여 세포수를 계산해서 세포 증식 정도를 확인하였다.

[0094] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 에피레굴린을 처리한 경우 모유두 세포의 증식이 증가함을 확인할 수 있었다.

실시예 4

[0096] **에피레굴린 단편에 의한 발모 효과 및 모유두 세포의 증식 효과 확인**

[0097] 4-1 : 발모 효과 확인

[0098] 본 발명에서는 에피레굴린 단편에 의한 발모 효과를 확인하기 위해, GQCIIYLSGDRC(서열번호 1)로 표시되는 11개의 아미노산을 펩트론에 의뢰하여 합성한 후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0099] 그 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이, 에피레굴린을 처리한 쥐에서 모발 성장기 유도가 빨라졌음을 알 수 있었다.

[0101] 4-2 : 모유두 세포의 증식 효과 확인

[0102] 본 발명에서는 에피레굴린 단편에 의한 발모 효과를 확인하기 위해, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

[0103] 그 결과, 도 4B에 나타난 바와 같이, 모유두 세포의 증식이 농도 의존적으로 현저하게 증가하는 것을 확인하였다.

실시예 5

[0105] 지방조직으로부터 지방유래 줄기세포의 분리 및 배양

[0106] 피하지방으로부터 공지된 방법(Kim *et al.* *J Dermatol Sci* 53:96-102, 2009)의 지방흡입술로 인간 지방유래 줄기세포를 수득하였다. 구체적으로, 병원으로부터 공급받은 인간 지방조직을 PBS(일반적으로 사용되는 버퍼)로 2번 세척한 후 0.075% 콜라게나아제(collagenase)를 첨가하여 37℃ 인큐베이터에서 50분간 흔들어 배양하였다. 그 다음으로 상기 배양액에 PBS와 α -MEM 배지를 절반씩 섞은 배지를 첨가한 다음, 1200 rpm에서 원심분리하고 상층액을 제거한 후 펠렛(pellet)으로 가라앉은 물질만을 사용하였다. 분리된 펠렛에 다시 PBS를 넣고 세게 섞은 다음 100 μ m 나일로 mesh로 걸러낸 후 원심분리하고 펠렛만을 수득하여 배지에 섞어 배양하였다. 수득된 지방줄기세포는 10% FBS(GIBCO, Invitrogen), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO)이 포함된 α -MEM 배지(Hyclone, Thermo Scientific)로 37℃, 5% CO₂에서 배양하여, 7~9 계대의 세포를 사용하였다. 유세포 분석을 통해 CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-1 및 PODXL의 양성 발현 및 CD34 및 CD45의 음성발현 특성을 확인하고(Kim *et al.* *Cell Death Dis* 4:e588, 2013; Kim *et al.*, *Cell Biol Int* 38:32-40, 2014), 지방세포, 골세포 및 연골세포로 분화하는 다분화능을 확인하였다(Song *et al.* *Stem Cells Dev* 17:451-461, 2008).

실시예 6

[0108] 에피레굴린 처리에 의한 지방줄기세포의 증식능력 향상 효과 확인

[0109] 실시예 1에서 얻은 지방줄기세포를 현미경으로 관찰하고, 트립신으로 세포를 떼운 후 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 하층에 세포만 남겨두었다. 1 X PBS를 첨가하여 세포를 잘 풀어준 후 트리판 블루로 염색하였다. 공식을 이용하여 세포수를 계산해서 세포 증식 정도를 확인하였다.

[0110] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 에피레굴린을 처리하여 배양한 경우 모두 대조군 대비 지방줄기세포의 증식이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

실시예 7

[0112] 에피레굴린 처리에 의한 지방줄기세포의 이동능 향상 효과 확인

[0113] 에피레굴린 처리에 따른 지방줄기세포의 이동능력 향상을 확인하기 위하여, 스크래치 분석(assay)과 트랜스웰(transwell)을 이용한 이동능력 테스트를 수행하였다.

[0114] 구체적으로, 스크래치 분석을 위해 동일 개수의 세포를 6 웰(well) 접시에 완전히 채울 때까지 배양한 다음 적당한 도구를 사용하여 스크래치를 생성하였고, FBS가 없는 배지와 5ng, 20ng 농도의 에피레굴린을 첨가한 배지로 구분하여 일정 시간 동안 관찰하고 사진을 찍어 결과를 분석하였다.

[0115] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 지방줄기세포에 에피레굴린을 처리한 후 세포 이동 수가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0117] 한편, 트랜스웰(transwell)을 이용한 이동능력 테스트는 동일개수의 세포를 10mm plate에 심고 다음날 40~50%정도 자랐을 때 원래 배지를 버린다. 그 후 FBS가 있는 정상배지와 5ng, 20ng 농도의 에피레굴린을 각각 첨가한 조성물 배지를 다시 첨가하여 2~3일동안 배양한다. 이것은 에피레굴린에 의한 분자기전을 주어 세포의 성장 및 이동능력이 있는 세포로 변화시키는 단계이다. 그 후 조성물 배지를 버리고 FBS가 없는 배지로 16시간 다시 배양한 후 동일개수의 세포를 트랜스웰에 시딩(seeding)한다. 이때 트랜스웰에 들어가는 배지는 항상 FBS가 없는 상태이어야 한다. 아래쪽 챔버 부분에는 FBS가 반드시 있는 정상 배지를 700ul 넣고 24시간 배양후 크리스탈 염색약으로 염색하여 트랜스웰 멤브레인을 이동한 세포의 개수를 분석하였다.

[0118] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 에피레굴린 처리 후 농도 의존적으로 지방줄기세포의 이동능력이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

실시예 8

[0120] 에피레굴린 처리에 의한 지방줄기세포의 자가 재생 효과 확인

[0121] 지방줄기세포 1×10^4 개를 seeding하고 24시간 후 에피레굴린(5,20ng)을 각각 처리한 후 10일 후 crystal violet 시약으로 염색하였다 10일 동안 3일 간격으로 에피레굴린을 총 3회 새로운 배지와 섞어 교체해주 었다. 그 후 사진 찍고 세포의 수가 50개 이상인 콜로니의 수를 세어 도 8에 나타내었다.

[0122] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 에피레굴린을 처리한 후 대조군 대비 지방줄기세포의 콜로니가 급격하게 증가한 것으로부터 자가 재생 효과를 확인할 수 있었다.

실시예 9

[0124] 에피레굴린 처리에 의한 지방줄기세포의 노화억제 효과 확인

[0125] 6 well 배양접시에 6계대 지방줄기세포를 1×10^5 농도로 접종하였다. 24시간 배양 후 에피레굴린을 각각 5, 20ng 처리하고 4일 동안 배양한 후 다시 계대를 높여가며 에피레굴린을 지속적으로 12계대까지 처리하였다. 12 계대 후 X-Gal kit (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 사용하여 세포를 염색하여 분석하였다.

[0126] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 에피레굴린을 처리하여 배양한 지방줄기세포의 노화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 10

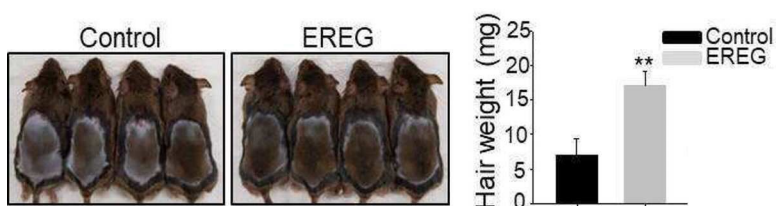
[0128] 실험동물에서 에피레굴린으로 전 처리된(Pre-treatment) 지방줄기세포의 발모 효과 확인

[0129] 에완동물용 털 제모기와 제모크림을 사용해서 6주령 male C3H 쥐의 등 부분의 털을 제거한 후 20 ng의 에피레굴린이 2일 동안 처리된 지방줄기세포를 쥐 등에 3×10^4 개씩 피하주사 하였다. 12~16일 후 쥐 등에 새로 자란 털을 밀고 무게측정을 통해서 털 재생하는 정도를 살펴보았다.

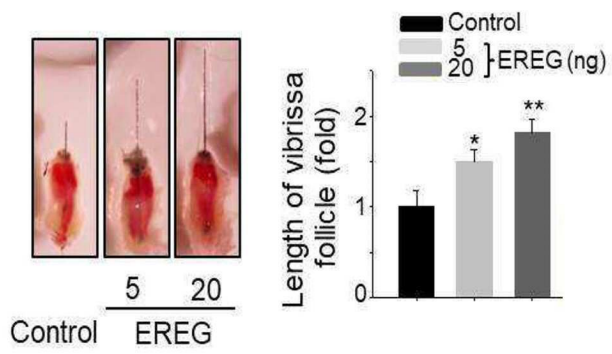
[0130] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 에피레굴린 전 처리된 지방줄기세포를 피하 주사한 쥐에서 모발 성장기 유도가 빨라졌음을 알 수 있었다.

도면

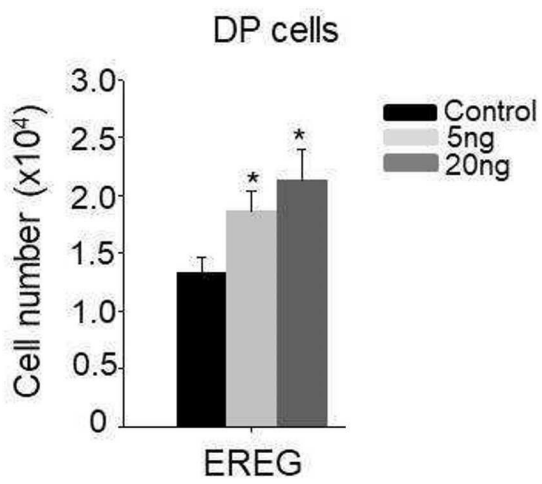
도면1



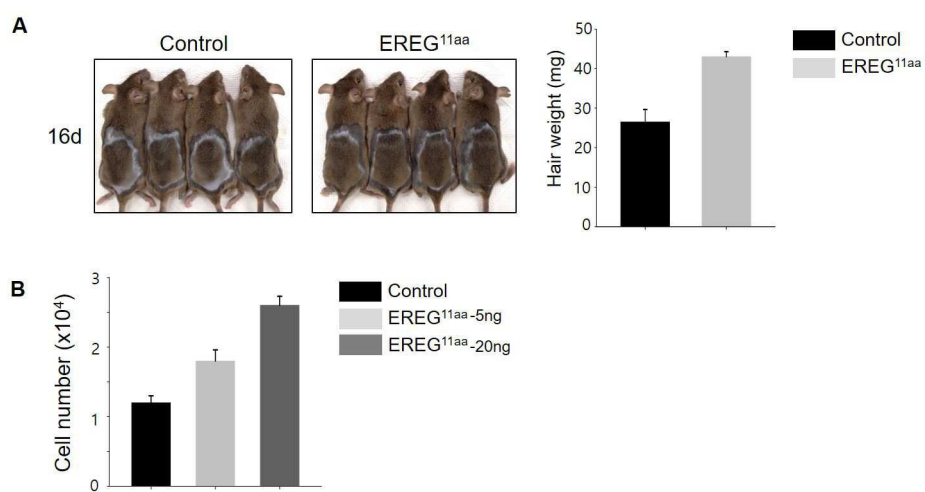
도면2



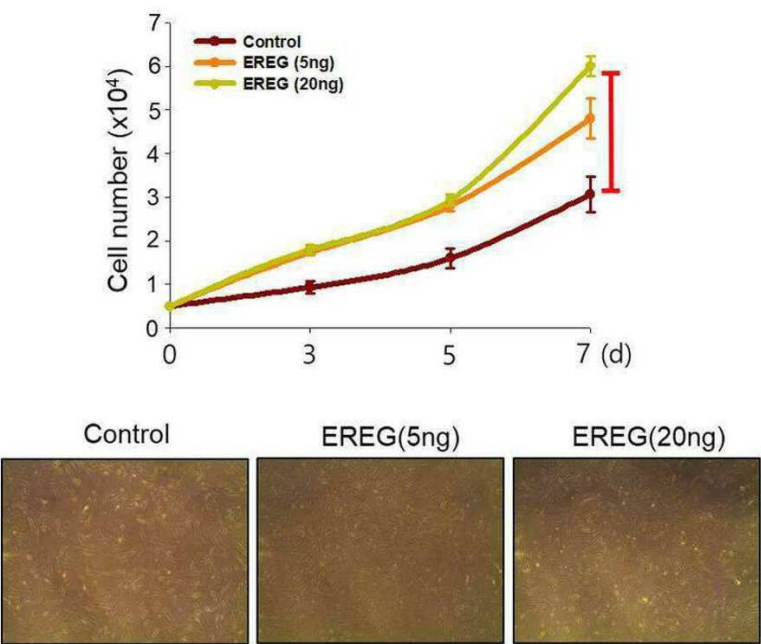
도면3



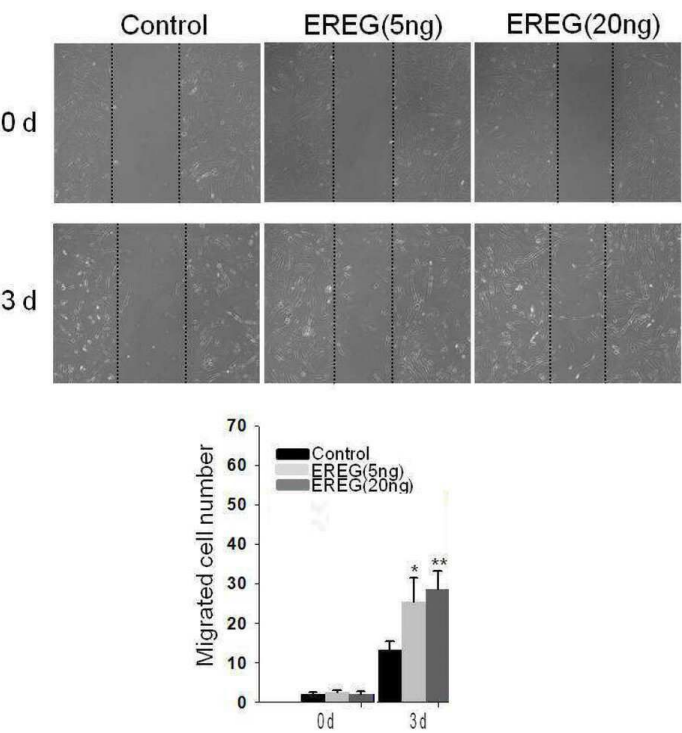
도면4



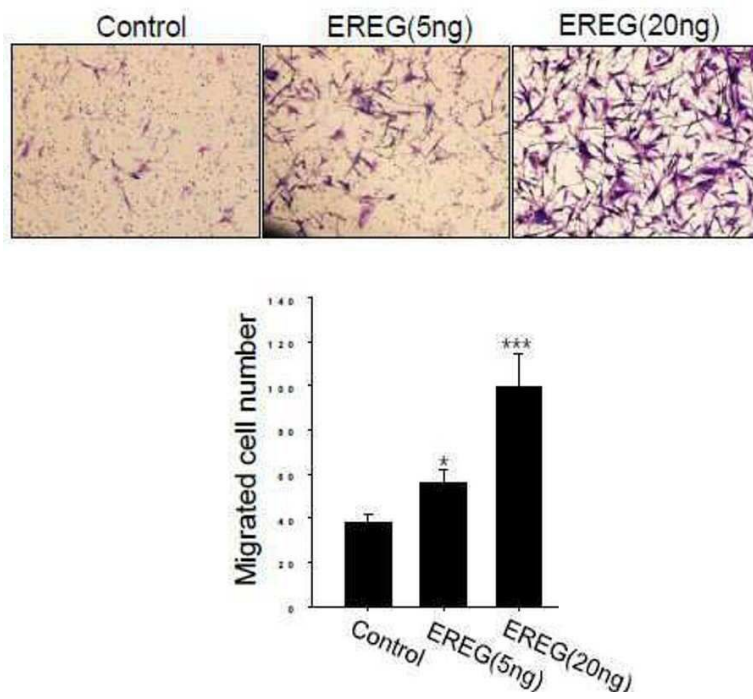
도면5



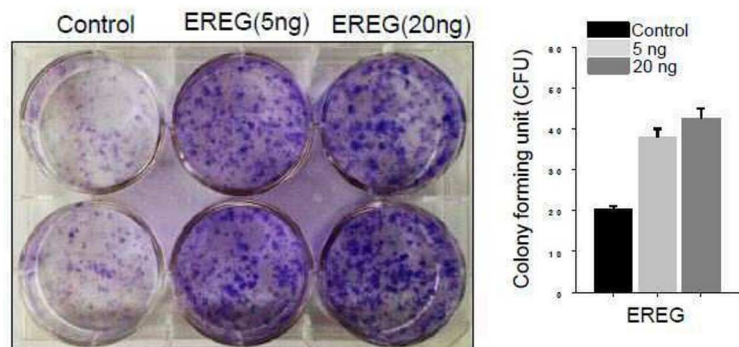
도면6



도면7

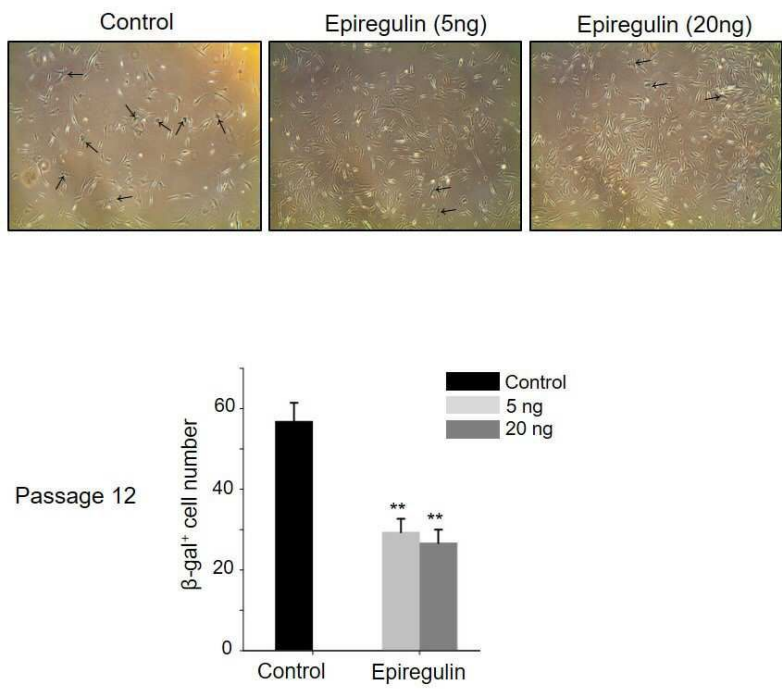


도면8

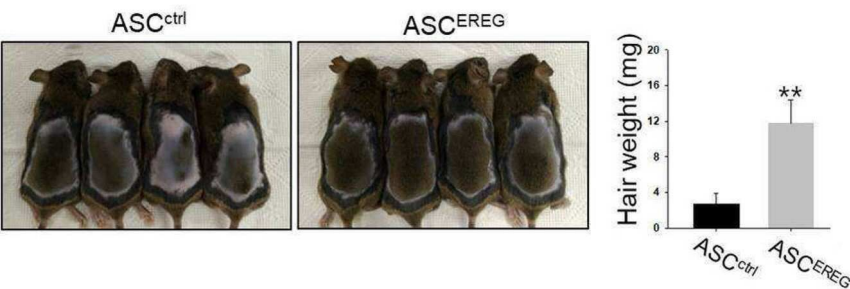


• CFU; colony including at least 50 cells

도면9



도면10



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Composition for preventing hair loss or promoting hair growth comprising epireguline or epiregulin-derived peptide as an active ingredient
- <130> 1066820
- <150> KR 10-2018-0158063
- <151> 2018-12-10
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 11

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epiregulin-derived peptide
 <400> 1
 Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Ser Gly Asp Arg Cys

1	5	10
---	---	----

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> epiregulin-derived peptide
 <400> 2
 Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Asn Asn Asn Asn Asn

1	5	10
---	---	----