



등록특허 10-2187371



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월04일

(11) 등록번호 10-2187371

(24) 등록일자 2020년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01) C07K 14/47 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0628 (2013.01)

A61K 35/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0094151

(22) 출원일자 2019년08월02일

심사청구일자 2019년08월02일

(56) 선행기술조사문헌

EP03459565 A1

(뒷면에 계속)

(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 4 항

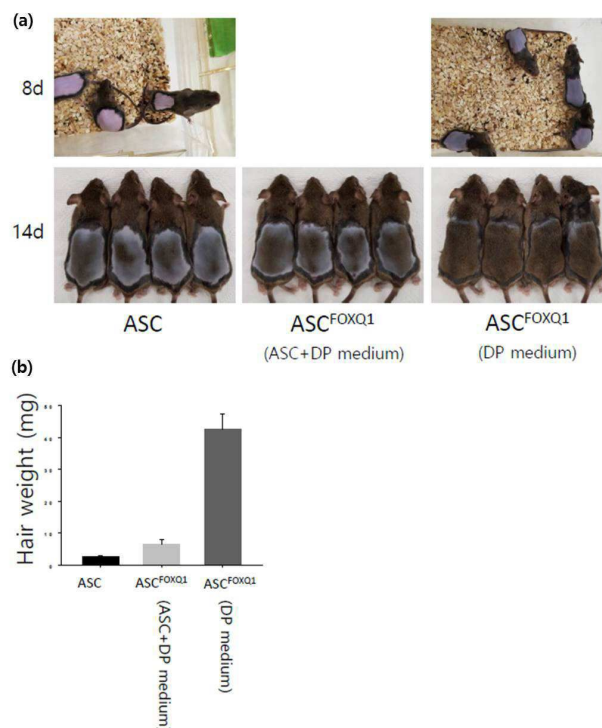
심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물 및 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화유도 방법에 관한 것이

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4

다.

본 발명의 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포(ASC^{FOXQ1})는 세포모양이 모유두세포처럼 변화했을 뿐만 아니라, 모유두세포 분화 마커인 LEF1 및 VERSICAN의 발현이 증가하였으므로, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 모유두세포로 분화 유도될 수 있는 것을 확인하였다.

또한, 마우스에 FoxQ1가 과발현된 지방유래 줄기세포를 이식한 결과, 모발생장기유도(anagen induction) 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 특히, 모유두세포 배양액에서 성장시킨 FoxQ1가 과발현된 지방유래 줄기세포의 경우 발모 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 또는 이의 배양액은 탈모 치료/방지 또는 발모 촉진을 위한 용도로 용이하게 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 17/14 (2018.01)
C07K 14/47 (2013.01)
C12N 5/0667 (2013.01)
C12N 2506/1384 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20080213882 A1
 US20100184033 A1
 W02010009735 A2
 W02018226828 A2

명세서

청구범위

청구항 1

지방유래 줄기세포에 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자를 과발현 시켜 분화를 유도한 모유두 유사세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 지방유래 줄기세포는 FoxQ1 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터를 지방유래 줄기세포에 형질전환시켜 제조한 것을 특징으로 하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

- (a) 생체의(in vitro)에서 지방유래 줄기세포에 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자를 도입하는 단계; 및
- (b) 상기 유전자가 도입된 세포를 배지에서 배양하여 모유두 유사세포를 수득하는 단계;를 포함하는 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 방법은 (c) 상기 (b) 단계의 모유두 유사세포를 3차원 배양하는 단계;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물 및 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화유도 방법에 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 나눌 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. 최근 탈모와 관련된 유전자를 모낭에 전달하거나, 유전자 발현을 차단하는 방법으로 시술되는 유전자 치료가 도입되었으나, 치료의 효능성, 치료비용, 안정성 등이 불확실하다는 단점이 있는바, 임상적용이 용이하지 않다.
- [0006] 유전자 치료 외에 줄기세포를 이용한 탈모치료 방법이 부각되고 있는데, 이 방법은 줄기세포가 가지고 있는 다분화능을 이용한 것으로서, 탈모 또는 무모 증상을 나타내는 곳에 줄기세포를 주입하여 모낭세포로 분화하도록 유도하는 것이다.
- [0007] 최근, 지방유래 줄기세포(ASC)가 성장인자를 분비하여, 모주기(hair cycle)의 성장기(anagen)을 유도한다는 보고가 있다. 최근, 얼굴 등에 지방유래 줄기세포를 이용한 지방이식수술 활발히 이루어지고 있으나, 상기 지방유래 줄기세포는 얼굴 등 이식부위에서 새로운 모낭을 형성하지는 못한다는 문제점이 있다. 한편, 지방유래 줄기세포의 발모효과는 기존 모낭에 지방유래 줄기세포가 분비하는 물질이 자극원으로 작용함으로써, 모발의 밀도 및 굵기를 증가시킬 수 있다. 다만, 지방유래 줄기세포는 patch assay에서 모유두세포보다 모발 재생능이 떨어진다는 보고가 으며, 지방유래 줄기세포가 분비하는 주요 성장인자는 여성형 탈모에 효과적이거나, 모낭 손상으로 인해 발생하는 남성형 탈모에는 효과적이지 못하다는 문제점이 있다.
- [0008] 대한민국 등록특허 제10-1425653호에서는 지방조직 유래 성체줄기세포와 두피조직 유래 모낭세포를 적절한 비율로 혼합하여 조성된 세포치료제가 탈모증 및 무모증과 같은 증상에 적용하여 발모의 효능을 이끌어 낼 수 있음을 밝히고 있고, 대한민국 등록특허 제10-1721228호에서는 LL-37 또는 EGR-1을 발현하는 지방유래 줄기세포 배양액이 모발증식효과가 우수하여 탈모 방지 및 발모촉진제의 원료로 매우 유용하게 사용할 수 있음을 밝힌바 있다.
- [0009] 이에, 본 발명에서는 보다 효과적인 탈모 예방 및 치료용 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포(ASC^{FOXQ1})제조하였다. ASC^{FOXQ1}을 마우스에 이식한 결과, 모발생장기유도(anagen induction) 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 특히, 모유두세포 배양액에서 성장시킨 ASC^{FOXQ1}의 경우 발모 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 유효성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위해,
- [0016] 본 발명은 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 FoxQ1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 지방유래 줄기세포는 FoxQ1 유전자가 삽입된 재조합 발현벡터를 지방유래 줄기세포에 형질전환시켜 제조한 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 모유두세포로 분화 유도된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한, (a) 지방유래 줄기세포에 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자를 도입하는 단계; 및 (b) 상기 유전

자가 도입된 세포를 배지에서 배양하여 모유두 유사세포를 획득하는 단계;를 포함하는 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화방법을 제공한다.

- [0022] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 (b) 단계의 배지는 지방유래 줄기세포 배양 배지, 모유두세포 배양 배지 또는 이들의 혼합배지이며, 상기 지방유래 줄기세포 배양 배지는 α -MEM, 모유두세포 배양 배지는 FBS, 소 뇌하수체 추출물(Bovine Pituitary Extract), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 및 인슐린(Insulin)이 첨가된 모유두세포 배양배지(Follicle Dermal Papilla Cell Media)일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 분화방법은 (c) 상기 (b) 단계의 모유두 유사세포를 3차원 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한, 상기 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 배양액은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 1 내지 7 일 동안 배양한 다음, 배양액을 수거하고 원심 분리하여 수득한 상등액일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 의약품 조성물일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 헤어토닉, 헤어로션, 헤어크림, 헤어스프레이, 헤어무스, 헤어젤, 헤어컨디셔너, 헤어샴푸, 헤어 린스, 헤어팩, 헤어 트리트먼트, 눈썹발모제, 속눈썹발모제, 속눈썹영양제, 애완동물용 샴푸 또는 애완동물용 린스의 제형일 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포(ASC^{FoxQ1})는 세포모양이 모유두세포처럼 변화했을 뿐만 아니라, 모유두세포 분화 마커인 LEF1 및 VERSICAN의 발현이 증가하였으므로, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 모유두세포로 분화 유도될 수 있는 것을 확인하였다.
- [0031] 또한, 마우스에 FoxQ1가 과발현된 지방유래 줄기세포를 이식한 결과, 모발생장기유도(anagen induction) 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 특히, 모유두세포 배양액에서 성장시킨 FoxQ1가 과발현된 지방유래 줄기세포의 경우 발모 효과가 현저하게 증가하는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 또는 이의 배양액은 탈모 치료/방지 또는 발모 촉진을 위한 용도로 용이하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 FoxQ1 유전자가 삽입된 렌티바이러스 벡터 모식도이다.
- 도 2는 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포, 지방유래 줄기세포 및 모유두세포의 세포 모양을 관찰한 데이터이다.
- 도 3은 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포에서 모유두세포 마커인 ACTA1, ALP, LEF1 및 VERSICAN의 발현정도를 확인한 데이터이다.
- 도 4는 (a) 제모한 마우스에 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 주입하고 12일경과 후, 털이 자란 모습 (b) 털의 무게를 잰 결과를 나타낸 데이터이다.
- 도 5는 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포에서 발현되는 다양한 성장인자의 발현 정도를 확인한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0036] 본 발명은 일관점에서, FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포에 관한 것이다.
- [0037] 상기 "지방유래줄기세포"는 지방 조직으로부터 유래한 줄기세포로서, 다분화능 및 자기증식능을 가진 세포를 의미하며, 본 발명의 지방유래줄기세포는 지방흡입술 및 다양한 외과적 수술을 통해 수득할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0038] 상기 FoxQ1(Forkhead box Q1)유전자는 Fox 유전자 계열의 구성원으로 포크헤드(forkhead) 또는 날개가 있는 나

선형 도메인(winged helix domain)이라고 불리는 110개의 아미노산 DNA 결합 모티프구조이다. FoxQ1 유전자는 배아 발생, 세포 주기 조절, 조직특이적 유전자 발현, 세포 신호전달 및 종양 형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 지방유래 줄기세포에 비해 모유두세포(dermal papilla cell)에 많이 발현되는 전사인자이다. 상기 FoxQ1 유전자는 바람직하게 서열번호 1의 염기서열로 표시될 수 있으나, 90% 이상, 93% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 상기 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 초대 배양(primary cultured) 줄기세포 또는 초대 배양 줄기세포의 계대배양 세포에 FoxQ1 유전자를 발현 가능한 형태로 포함하는 벡터를 도입하여 안정화(stabilization)시킨 줄기세포이다.

[0040] FoxQ1 유전자의 도입은 FoxQ1 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 재조합 발현벡터를 지방유래 줄기세포에 형질전환시켜 수행될 수 있으며, 상기 재조합 발현 벡터는 재조합 바이러스 벡터, 플라스미드(plasmid) 또는 전이인자(transposon)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 상기 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터(adenovirus vector), 아데노-관련 바이러스 벡터(adeno-associated virus vector), 레트로 바이러스 벡터(retrovirus vector), 헤르페스바이러스 벡터(herpesvirus vector), 렌티바이러스 벡터(lentivirus vector) 및 아비폭스바이러스 벡터(avipox virus vector)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 렌티바이러스 벡터인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 더 나아가, 상기 벡터를 지방유래 줄기세포 내로 운반하는 방법은 공지된 트랜스펙션(transfection) 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 미세 주입법(Capecci, M.R., Cell 22, 479 (1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. *et al.*, Virology 52, 456 (1973)), 전기 천공법(Neumann, E. *et al.*, EMBO J. 1, 841 (1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. *et al.*, Gene, 10, 87 (1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol. 5, 1188-1190 (1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9568-9572 (1990)) 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 지방유래 줄기세포에 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자를 도입하는 단계; 및 (b) 상기 유전자가 도입된 세포를 배지에서 배양하여 모유두 유사세포를 수득하는 단계;를 포함하는 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 따른 지방유래 줄기세포의 모유두세포로의 분화방법은 구체적으로 다음과 같다.

[0045] 먼저, (a) 단계는 지방유래 줄기세포에 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자를 도입하는 단계이다.

[0046] FoxQ1 유전자 도입은 상술한 방법에 따라 수행할 수 있으며, 상기 FoxQ1 유전자가 도입된 지방유래줄기세포는 모유두세포로 분화 유도됨으로써, 모낭 형성을 촉진할 수 있다.

[0047] 다음으로, 상기 (b) 단계는 FoxQ1 유전자가 도입된 세포를 배지에서 배양하여 모유두 유사세포를 얻는 단계로, 구체적으로, 상기 유전자가 도입된 세포의 배양배지에는, 상기 벡터의 선택표지로서 항생제 내성 유전자를 추가로 첨가할 수 있으며, 블라스티사이드인, 앰피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신, 푸로마이신 및 테트라사이클린인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 배지는 지방유래 줄기세포 배양 배지, 모유두세포 배양 배지 또는 이들의 혼합배지인 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 상기 지방유래 줄기세포 배양 배지는 α -MEM, 모유두세포 배양 배지는 FBS, 소 뇌하수체 추출물(Bovine Pituitary Extract), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 및 인슐린(Insulin)이 첨가된 모유두세포 배양배지(Follicle Dermal Papilla Cell Media)일 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 분화방법은 (c) 상기 (b) 단계의 모유두 유사세포를 3차원 배양하는 단계를 추가로 포함되는 것을 특징으로 한다. 상기 "3차원(3D) 배양"은 세포가 배양접시에 부착되지 않고 액체배지에 부유상태로 배양되는 방법을 의미하며, 상기 모유두 유사세포를 3차원 현적 배양(hanging drop)함으로써, 모낭 형성을 촉진할 수 있는바, 발모 촉진 효과를 증대시킬 수 있다.

[0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

[0052] 구체적으로, 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.

- [0053] 상기 FoxQ1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하며, 구체적으로, 상술한 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0054] 또한, 상기 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 모유두세포로 분화 유도된 것으로,
- [0055] (a) 지방유래 줄기세포에 FoxQ1(Forkhead box Q1) 유전자를 도입하는 단계; 및 (b) 상기 유전자가 도입된 세포를 배지에서 배양하여 모유두 유사세포를 수득하는 단계;를 포함하는 방법을 통해 모유두세포로 분화를 유도한 것을 특징으로 할 수 있으며, 구체적으로, 모유두세포로의 분화방법은 상술한 방법에 따라 수행할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 구체적인 일구현예에서, FoxQ1 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 삽입된 재조합 발현벡터(도 1)를 지방유래 줄기세포에 도입시켜, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포(ASC^{FoxQ1})를 제조하였다.
- [0058] 도 2에 나타난 바와 같이, ASC^{FoxQ1}와 지방유래 줄기세포(ASC) 및 모유두세포(dermal papilla cell; DP cells)의 세포 모양을 관찰한 결과, ASC^{FoxQ1}의 세포 크기가 감소하고, 세포모양이 모유두세포처럼 변한 것을 확인하였다.
- [0059] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 모유두세포 마커가 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포에서 발현되는지 확인한 결과, LEF1 및 VERSICAN등 모유두세포 분화 마커의 발현이 현저하게 증가한 것을 확인하였다.
- [0060] 본 발명의 구체적인 다른 일구현예에서, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포에서 분화된 모유두 유사세포를 발모한 마우스의 등에 주입한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 모발성장기유도(anagen induction) 효과가 우수한 것을 확인하였다. 특히, 지방유래 줄기세포 배양 배지 및 모유두세포 배지를 혼합하여 분화를 유도한 그룹에 비해, 모유두세포 배지 단독으로 분화를 유도한 그룹이 발모 효과가 우수한 것을 확인하였다.
- [0061] 본 발명의 구체적인 다른 일구현예에서, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포에서 발현되는 다양한 성장인자의 mRNA 발현정도를 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, SPP1 및 BMP2 등 성장인자 발현이 증가한 것을 확인하였다.
- [0062] 따라서, 본 발명에 따른 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 모유두세포로 분화 유도됨으로써, 미분화 지방유래 줄기세포와 비교하여 모발 성장기 유도가 효율적일 뿐만 아니라, 피부에 이식하였을 때 새로운 모낭을 형성할 수 있는바, 탈모 치료 또는 발모 촉진에 이용될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 또 다른 관점에서, FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다.
- [0065] 구체적으로, 상기 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포는 FoxQ1 유전자를 지방유래줄기세포에 형질전환시켜 제조할 수 있으며, 상기 모유두세포는 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 배양하여 분화를 유도한 모유두 유사세포로, 구체적으로, 상술한 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명에 따른 지방유래 줄기세포 배양액은 상기 지방유래 줄기세포를 1 내지 7일 동안 배양한 후, 배양액을 수거하고 원심 분리하여 수득한 상등액일 수 있으며, 1 내지 4일 동안 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이때, 상기 지방유래줄기세포의 배양 기간이 상기 범위 미만인 경우, 지방유래줄기세포 및 상기 세포로부터 분화된 세포에서 분비되는 단백질의 수득률이 저하되는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 지방유래줄기세포 및 분화된 세포의 세포사(apoptosis)가 촉진되는 문제점이 있다.
- [0068] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 화장품 조성물로 제조될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조될 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 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, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0070] 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.

- [0071] 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. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.
- [0072] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 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.
- [0074] 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.
- [0075] 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, 소독청결제, 물티슈, 마스크, 연고제, 패치 또는 필터 충전제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 의약품을 모두 포함한다.
- [0076] 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 담체들을 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 조성물의 함량은 총 중량을 기준으로 각각 0.0001 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 10 중량%를 초과하는 경우에는 조성물 제조시 색상 및 안정성이 떨어지며, 0.0001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미미하다는 단점이 있다. 본 발명의 데칸알을 유효성분으로 포함하는 의약품 조성물은 치료 지수에서 확인한 바와 같이 세포에 대한 독성 및 부작용이 거의 없어 의약품 재료로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0079] 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.
- [0080] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0081] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0082] 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.
- [0083] 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.
- [0084] 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.
- [0085] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코

올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0087] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0088] 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

[0090] **FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 제작**

[0091] 1-1: 지방유래 줄기세포 분리

[0092] 피하 지방조직을 환자의 동의 하에 수술 중 확보하였으며, 이는 연세대학교 신촌세브란스병원으로부터 승인을 받아 진행하였다. 지방유래 줄기세포를 분리하기 위해 지방조직에 동량의 0.1% 콜라게나아제 타입 I(Sigma, 미국)용액을 처리하고 간헐적으로 섞어주면서 37℃에서 60분간 처리하였다. 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 간질혈관분획(stromal vascular fraction)으로부터 부유 지방세포를 분리하였다. 세포 펠렛은 10% FBS, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 추가적으로 포함하는 α-MEM 배지에 부유시킨 다음, 세포 배양 디쉬에 플레이트 하였다. 디쉬가 포화 상태에 이를 때까지 초대 지방유래 줄기세포를 4~5일간 배양하고 이를 계대 0으로 하였다. 실험에는 계대 3의 지방유래 줄기세포를 사용하였다.

[0094] 1-2: FoxQ1 유전자 도입

[0095] 상기 실시예 1-1에서 분리한 지방유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell)를 α-MEM 배지에 넣고 1×10^4 (cell/well)개 세포가 되도록 100mm 플레이트에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다.

[0096] 이후, 서열번호 1의 염기서열로 포시되는 FoxQ1 유전자를 도 1의 모식도와 같이 렌티바이러스(Lentivirus) 벡터에 삽입하여, FoxQ1 유전자가 삽입된 렌티바이러스 벡터 제조하였다. 상기 벡터를 상기 지방유래 줄기세포에 형질도입(transduction)시킨 후, 48시간 동안 추가 배양하였다. 이후, 배지를 갈아 주고 2일 동안 배양하였다. 형질 도입된 세포만 선택적으로 획득하기 위해 유전자에 대한 내성을 가지는 항생제(puromycin)를 배지에 4 µg/ml의 농도로 처리하였다. 3일 후, 렌티바이러스가 도입된 살아남은 세포들을 3일 동안 신선한 배지에서 배양하면 콜로니(colony) 형태의 세포가 모여서 자라는 현상을 관찰할 수 있는데, 상기 현상이 관찰되면 계대 배양을 1회 한 후 5 ~ 6 일 동안 배양하여 최종적으로 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포(ASC^{FoxQ1})를 제작하였다.

[0097] 상기 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 배양하여 모유두 유사세포를 수득할 수 있으며, 세포의 밀도가 배양 접시의 80 ~ 90%가 되면 계대 배양을 수행하였다.

실시예 2

[0099] **FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포 특성 관찰**

[0100] 2-1: 세포모양 관찰

[0101] 상기 실시예 1에서 제작한 FoxQ1 유전자 과발현된 지방유래 줄기세포가 모유두세포로 분화되었는지 확인하기 위해, ASC^{FoxQ1}와 지방유래 줄기세포(ASC) 및 모유두세포(dermal papilla cell; DP cells)의 세포 모양을 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0102] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, ASC^{FoxQ1}의 세포 크기가 감소하고, 세포 모양이 모유두세포처럼 변한 것을 확인하였다.

[0104] 2-2: 모유두세포 마커 발현 확인

[0105] 트리졸(Trizol)을 이용하여 실시예 1에서 제조한 FoxQ1 유전자 과발현된 지방유래 줄기세포의 세포막을 파괴하였다. 이후, 1/5 부피(volume)의 클로로포름(chloroform) 용액을 첨가하고 10초간 강하게 vortex를 이용하여 섞어주었다. 잘 섞인 용액을 4℃에서 14,000rpm 조건으로 15분 동안 원심분리 하였다. 이후, 두 층으로 나뉜 용액

중 위층을 획득하여 동일한 부피의 아이소프로판올(isopropanol)을 넣고 최소 30분 이상 -20℃에 보관하였다. 4℃에서 14,000rpm 조건으로 15분 동안 원심분리 한 후, 용액을 제거하고, 가라앉은 펠렛에 70% 에탄올을 첨가한 후 4℃에서 14,000rpm 조건으로 5분 동안 원심분리 하였다. 상기에서 첨가된 에탄올을 제거하고, 펠렛을 상온에서 건조시켰다. 펠렛을 증류수(DEPC water)로 녹인 후 정량 하였다.

[0106] 정량한 총 RNA 중 500ng을 이용하여 50ng/ μ l의 oligo (dT) primer, 10mM의 dNTP, 10,000U의 역전사효소와 함께 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA 및 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 모유두세포의 특징을 가지는 유전자 ACTA1, ALP(alkaline phosphatase), LEF1 및 VERSICAN의 발현 정도를 실시간 QPCR(quantitative-PCR)을 이용하여 분석 하였다.

표 1

[0108] PCR 수행을 위한 프라이머 정보

	프라이머 서열(5'-3')	서열 번호
ACTA1	GGCATTACGAGACCACCTAC	2
	CGACATGACGTTGTTGGCATAC	3
ALP	ACCACCACGAGAGTGAACCA	4
	CGTTGTCTGAGTACCAGTCCC	5
LEF1	AGAACACCCCGATGACGGA	6
	GGCATCATTATGTACCCGGAAT	7
VERSICAN	GTAACCCATGCGCTACATAAAGT	8
	GGCAAAGTAGGCATCGTTGAAA	9
GAPDH	TGTGGGCATCAATGGATTGG	10
	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT	11

[0109] 도 3에 나타난 바와 같이, 분화되지 않은 지방유래줄기세포와 비교하였을 때, LEF1 및 VERSICAN 등 모유두세포 분화 마커의 발현이 현저하게 증가한 것을 확인하였다.

[0110] 즉, 본 발명에 따른 FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래 줄기세포를 배양하면 모낭세포의 특징을 가지는 유전자를 발현할 수 있는 바, 상기 지방유래 줄기세포는 모유두세포로 분화 유도됨을 확인하였다.

실시예 3

[0112] FoxQ1 유전자가 과발현된 지방유래줄기세포에 의한 발모 효과 확인

[0113] 생후 6주령 된 수컷 C3H/HeN 마우스 12 마리를 제모기계를 이용하여 털을 짧게 밀고, 제모제를 이용하여 남아있는 털을 완벽하게 제거한 후, 하루 동안 안정화 시켜 실험에 사용하였다.

[0114] 각 그룹별 4마리씩 나누어 실험을 수행하였으며, 그룹은 하기와 같다.

[0115] 그룹 1: ASC 투여군(대조군), ASC 배양 배지(α -MEM + 10% FBS + 1 X 페니실린-스트렙토마이신)에서 6 ~ 7일 동안 배양

[0116] 그룹 2: ASC^{FOXQ1} 투여군, 지방유래 줄기세포 배양 배지(α -MEM + 10% FBS + 1 X 페니실린-스트렙토마이신) + 모유두세포 배양 배지(dermal papilla medium + 0.1% anti-antibiotics)에서 6 ~ 7일 동안 배양

[0117] 그룹 3: ASC^{FOXQ1} 투여군, 모유두세포 배양 배지(dermal papilla medium + 0.1% anti-antibiotics)에서 6 ~ 7일 동안 배양

[0118] 상기 모유두세포 배양 배지는 FBS, 소 뇌하수체 추출물(Bovine Pituitary Extract), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 및 인슐린(Insulin)이 첨가된 모유두세포 배양배지(Follicle Dermal Papilla Cell Media)이다. 본 발명에서는 PromoCell 회사에서 모유두세포 배양 배지(Follicle Dermal Papilla Cell Media)를 구매하여 사용하였으며, 지방유래 줄기세포의 모유두세포 분화 유도를 위해 Follicle Dermal Papilla Cell Media에 growth medium supplement Mix(PromoCell) 및 항생제 0.1% (Gibco)성분을 추가로 첨가하여 사용하였다.

[0120] 그 다음, 그룹별 세포가 3×10^4 개가 되도록 PBS 100 μ l에 섞은 후 상기 마우스의 등 부분에 1회 피하 주사하였

다. 세포 주입 후 14일 동안 상기 마우스 등 부분의 발모 정도를 추적 관찰 하였다. 14일 후, 발모가 일어난 마우스의 등 부분을 면도칼을 이용하여 면도 한 후 털을 획득하여 무게를 측정하였다.

[0121] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, ASC^{FOXQ1}를 투여한 그룹의 모발성장기유도(anagen induction) 효과가 대조군인 ASC 투여 그룹에 비해 우수한 것을 확인하였다. 특히, 지방유래 줄기세포 배양 배지 및 모유두세포 배지를 혼합하여 분화를 유도한 그룹에 비해, 모유두세포 배지 단독으로 분화를 유도한 그룹이 발모 효과가 현저하게 우수한 것을 확인하였다.

실시예 4

[0123] FoxQ1 유전자 도입에 따른 성장인자 발현 변화 확인

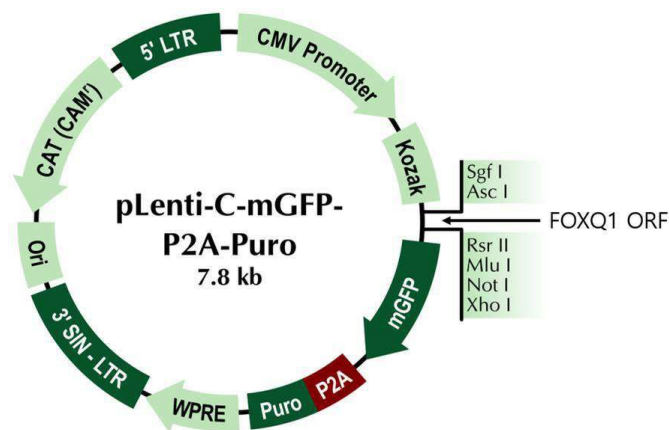
[0124] 본 발명에서는 FoxQ1 유전자 도입에 의해 지방유래 줄기세포에서 발현되는 다양한 성장인자의 발현량 변화 정도를 확인하고자 하였다.

[0125] 상기 실시예 2-2와 동일한 방법으로 RNA를 분리한 다음, cDNA를 합성하였으며, Growth Factor PCR Array를 사용하여 다양한 성장인자의 발현정도를 확인하였다.

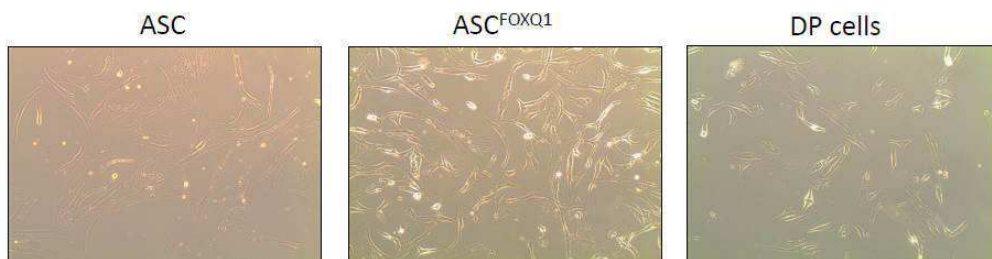
[0126] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, FoxQ1 도입에 의해 다양한 성장인자들의 발현이 증가한 것을 확인하였으며, 특히, SPP1 및 BMP2의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

도면

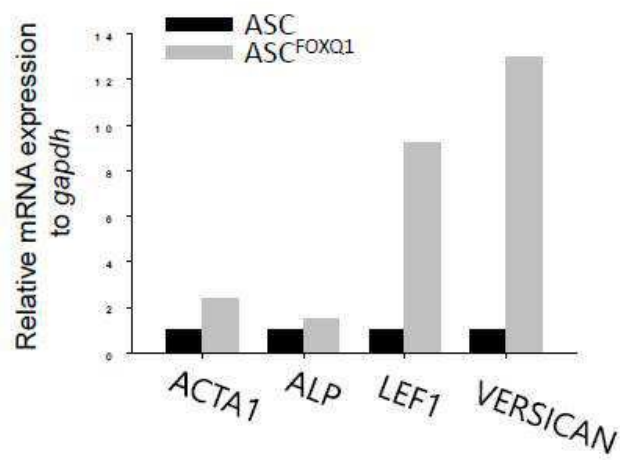
도면1



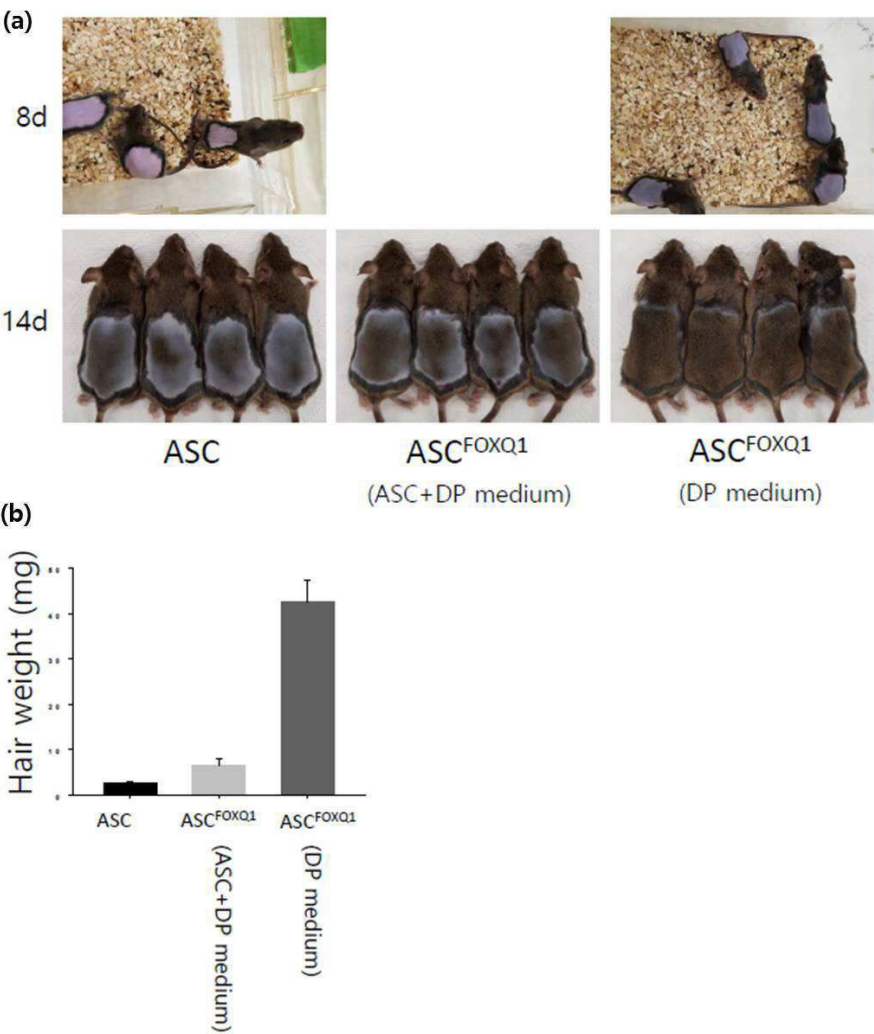
도면2



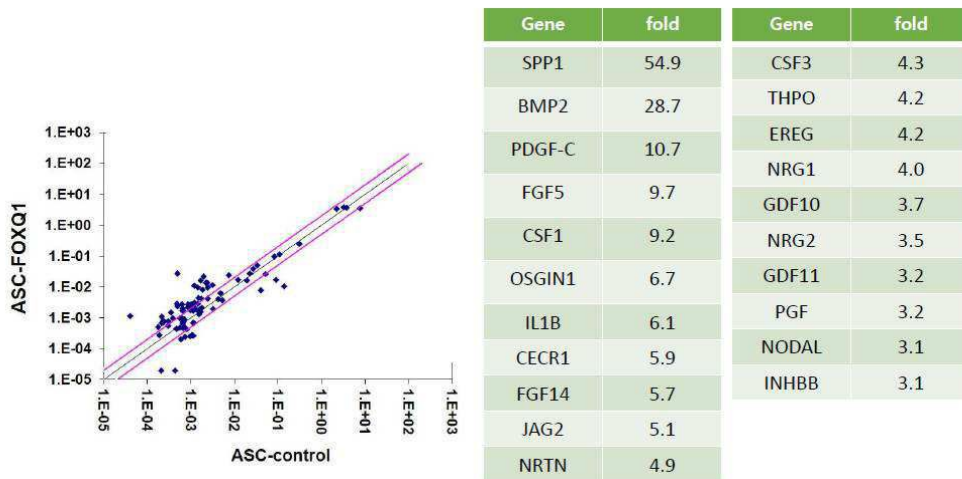
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
 <120> adipose-derived stem cell overexpressing FoxQ1 and uses thereof
 <130> 1066045
 <160> 11
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 1209
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FOXQ1
 <400> 1

```

atgaagttgg aggtgttcgt ccctcgcgcg gccacagggg acaagcaggg cagtgcctg      60
gagggcgcgg gcggcagcga cgcgccgtcc ccgtgttcgg cggcgggaga cgactccctg      120
ggctcagatg gggactgcgc ggccaacagc ccggccgcgg gcggcggcgc cagagatccg      180

ccgggcgcacg gcgaacagag tgcgggaggc ggcccgggcg cggaggaggc gatcccggca      240
gcagctgctg cagcgggtgtt ggccggagggc gcggaggccg gggcggcggg gccaggcgcg      300
ggcggcgcgg ggagcggcga ggggtgcacgc agcaagccat atacgcggcg gcccaagccc      360
ccctactcgt acatgcgct catcgccatg gccatccgcg actcggcggg cgggcgcttg      420
acgctggcgg agatcaacga gtacctcatg ggcaagtcc ctttttccg cggcagctac      480
acgggctggc gcaactccgt gcgccacaac ctttcgtca acgactgctt cgtcaaggtg      540
    
```

ctgcgcgacc cctcgcggcc ctggggcaag gacaactact ggatgctcaa ccccaacagc 600

gagtacacct tcgccgacgg ggtcttccgc cgccgccgca agcgccctcag ccaccgcgcg 660

ccggtccccg cgcccgggct gcggcccgag gaggccccgg gcctccccgc cgcccgccg 720

cccgcgcccg ccgccccggc ctgcgccgc atgcgctcgc ccgcccgcca ggaggagcgc 780

gccagccccg cgggcaagtt ctccagctcc ttgccatcg acagcatcct gcgcaagccc 840

ttccgcagcc gccgcctcag ggacacggcc ccggggacga cgcttcagtg gggcgccgcg 900

ccctgccccg cgctgccccg gttccccgcg ctctccccg cggcgccctg cagggccctg 960

ctgccgtctt gcgcgtacgg gcggggcgag ccggcgcggc tgggcgcgcg cgaggccgag 1020

gtgccaccga ccgcgccgcc ctcctgtctt gcacctctcc cggcgggcggc ccccgccaag 1080

ccactccgag gcccgggcggc cggcgggcgcg cacctgtact gccccctgcg gctgcccga 1140

gccctgcagg cggcctcagt ccgccgcctt ggccccgacc tgccgtaccc ggtggagacg 1200

ctcctagcc 1209

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACTA1_F

<400> 2

ggcattcacg agaccaccta c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACTA1_R

<400> 3

cgacatgacg ttgttgcat ac 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ALP_F

<400> 4

accaccacga gagtgaacca	20
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ALP_R	
<400> 5	
cgttgtctga gtaccagtcc c	21
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LEF1_F	
<400> 6	
agaacacccc gatgacgga	19
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> LEF1_R	
<400> 7	
ggcatcatta tgtaccgga at	22
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VERSICAN_F	
<400> 8	
gtaacctatg cgctacataa agt	23
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> VERSICAN_R

<400> 9

ggcaaagtag gcatcgttga aa 22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_F

<400> 10

tgtgggcatc aatggatttg g 21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_R

<400> 11

acaccatgta ttccgggtca at 22