



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월18일

(11) 등록번호 10-2124272

(24) 등록일자 2020년06월11일

(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 10-2019-0016824

(22) 출원일자 2019년02월13일

심사청구일자 2019년02월13일

(30) 우선권주장  
 1020180158063 2018년12월10일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌  
 J Cell Biochem, vol.119,  
 pp.7676~7685(2018.07.16.)\*  
 \*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 독배로 58, 201동 601호(옥련동, 현대2차아파트)

(74) 대리인  
 특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 4 항

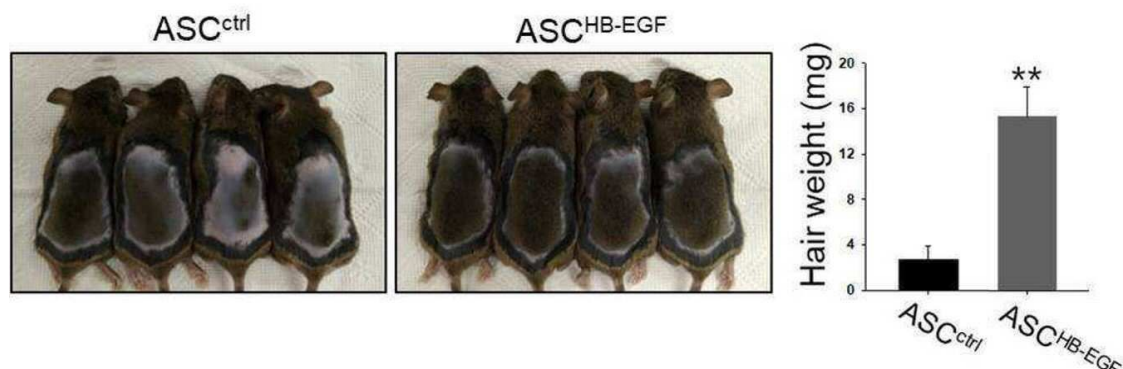
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 HB-EGF를 유효성분으로 포함하는 지방줄기세포의 발모능 증진용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 HB-EGF 유사 성장인자(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)를 유효성분으로 함유하는 발모 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 HB-EGF에 의해 증식능 및 이동능이 증가하고, 세포 노화가 억제된 지방줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 치료제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 HB-EGF로 처리된 지방줄기세포는 증식능, 이동능 증가 및 노화 억제를 통해 모발 재생능이 향상되어, 탈모 치료제 또는 탈모 예방용 화장품으로 유용하다.

### 대표도 - 도6



(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

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor)로 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 조성물은 세포 이식 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물.

#### 청구항 8

HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor)를 처리하여 배양된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장품 조성물.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

## 발명의 설명

### 기술분야

본 발명은 HB-EGF로 처리된 지방줄기세포를 유효성분으로 함유하는 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0003] 최근, 탈모와 관련된 유전자를 모낭에 전달하거나 유전자 발현을 차단하는 방법으로 시술되는 유전자 치료법이 개발되었으나, 치료의 효능 및 안전성이 불확실하고, 치료비용이 고가이어서 임상 적용이 용이하지 않다는 문제점이 있다. 이러한 이유로 유전자 치료 외에 줄기세포를 이용한 탈모치료 방법이 최근 각광받고 있다.
- [0004] 지방유래줄기세포(Adipose-derived Stem Cells)는 중간엽 줄기세포로 피부의 상처치유 및 노화예방 효과를 나타낸다(Kim *et al.*, *J Dermatol Sci* 53:96-102, 2009; Altman *et al.*, *Stem Cells* 27:250-258, 2009). 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 HB-EGF의 기능 및 효과는 아직까지 확인된 바가 없다.
- [0005] 본 발명자들은 지방줄기세포의 생산 수율 향상 및 발모 효과 증대를 위한 방법을 개발하기 위해 예의 연구한 끝에 HB-EGF 처리에 의해 지방줄기세포의 증식, 이동이 증가하고, 노화가 억제되며 모발 재생능이 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 지방줄기세포의 발모 유도능을 강화시킬 수 있는 증식방법을 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 지방줄기세포의 증식능, 이동능, 노화 억제능을 강화시킬 수 있는 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0009] 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.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)가 첨가된 배지에서 지방 유래의 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 지방줄기세포의 증식방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, Hb-EGF를 유효성분으로 함유하는 지방줄기세포의 증식 또는 이동 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, HB-EGF를 유효성분으로 함유하는 지방줄기세포의 노화 억제용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, HB-EGF로 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, HB-EGF를 처리하여 배양된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따른 HB-EGF로 처리된 지방줄기세포는 증식능, 이동능이 향상되고 노화가 억제되어, 탈모 치료제 또는 탈모 예방 또는 개선용 화장품으로 유용하다.
- [0020] 본 발명에 따른 HB-EGF로 처리된 지방줄기세포는 배양시 증식능이 현저하게 증가하여 배양 기간이 획기적으로 줄어든다는 장점이 있다.

[0021] 본 발명에 따르면, HB-EGF로 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

- [0023] 도 1은 HB-EGF 처리에 따른 지방줄기세포의 증식능 향상 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2은 HB-EGF 처리에 따른 지방줄기세포의 이동능 향상 효과를 스크래치 분석을 통해 나타낸 것이다.
- 도 3는 HB-EGF 처리에 따른 지방줄기세포의 이동능 향상 효과를 트랜스웰(transwell)을 이용하여 나타낸 것이다.
- 도 4는 HB-EGF 처리에 따른 지방줄기세포의 재생능력 향상 효과를 콜로니 형성능 분석(clonogenic assay)을 통해 나타낸 것이다.
- 도 5은 HB-EGF 처리에 따른 지방줄기세포의 노화 억제 효과를 베타 갈락토시데이즈 (beta-galactocidase)염색을 통해 나타낸 것이다.
- 도 6은 실험동물에서 HB-EGF 전 처리된 지방줄기세포의 발모 효과를 확인한 도면이다.
- 도 7은 실험동물에서 HB-EGF의 발모 효과를 확인한 도면이다.
- 도 8은 HB-EGF를 처리하여 생쥐의 성장기 콧수염 길이 증가를 확인한 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 헤파린 결합 EGF 유사 성장인자(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)를 유효성분으로 함유하여 지방줄기세포의 증식 촉진, 이동 촉진, 노화 억제 및 발모 유도능을 강화시킬 수 있는 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 지방줄기세포(지방유래 줄기세포, Adipose-derived stem cells)는 개체의 지방조직에서 얻을 수 있는 성체줄기세포(Adult stem cells)를 말한다. 이러한 지방 줄기세포는 지방세포는 물론 근육세포, 연골세포, 뼈세포 등 다양한 종류의 세포로 분화될 수 있는 능력을 가진 다분화능력세포(Multipotent stem cell)이며, 스스로 증식할 수 있는 능력이 있다. 본 발명에서의 지방 줄기세포는 이에 한정되지는 않으나, 주로 인간의 피하지방조직에서부터 지방흡입(liposuction) 방법으로 수득할 수 있으며, 바람직하게는 자신의 피하지방 조직에서 수득한 자가 지방 줄기세포일 수 있다.
- [0028] 상기에서 지방흡입 방법은 주사기를 이용하여 몸에서 지방을 채취하는 것으로 일반적으로, 복부나 둔부의 피하 지방조직에서 미세도관을 이용해 지방을 흡입한 후 이를 원심분리를 하여 정제하는 방법을 말한다. 이러한 방법을 통하여 비교적 많은 양의 세포를 추출할 수도 있으나, 충분히 지방세포로 분화되지 않은 세포는 이식 후 발모와 관련된 지방세포 등으로의 분화를 확신할 수 없으며, 완전히 성숙한 지방세포는 세포수집 과정에서 손실되거나 이식 후 생착율이 떨어지는 등 효율이 낮고, 대부분의 경우 발모 촉진이나 탈모 예방/치료에 활용하기에는 충분하지 않은 양으로 추출되므로 본 발명의 기술을 이용하여 발모능을 높이는 경우 큰 의미가 있다.
- [0030] 본 발명에서 지방줄기세포의 발모능을 높이기 위해 처리되는 HB-EGF는 표피성장인자(Epidermal Growth Factor)의 패밀리로써 피부세포의 분화와 성장에 중요한 역할을 한다. 본 발명에서는 지방줄기세포 배양 시 HB-EGF를 처리하는 경우 지방줄기세포의 발모능력, 이동능력, 재생능력 및 노화억제능력이 증진되는 점이 확인되었다.
- [0031] 상기 HB-EGF는 5 ~ 50 ng/ml의 농도로 처리될 수 있다. 본 발명의 지방줄기세포 배양 시 HB-EGF를 추가로 넣은 배지에서 48 내지 72시간 동안 배양함으로써 발모능을 증진시킬 수 있다. 즉, 본 발명은 HB-EGF를 포함하는 배지에 지방줄기세포를 접종하고 48 내지 72시간 동안 배양하는 것에 의해서 수행될 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 지방줄기세포 배양 배지에 HB-EGF를 처리하여 배양하는 단계;를 포함하는, 지방줄기세포의 발모 유도능을 강화시킬 수 있는 증식 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 배양 배지에 함유되는 HB-EGF는 상기한 바와 같이 5 ~ 50 ng/ml의 농도로 첨가될 수 있다.

- [0035] 본 발명의 배양 단계는 HB-EGF를 포함하는 배지에 지방 줄기세포를 접종하고 48 내지 72시간 동안 배양하는 것일 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 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),  $\alpha$ -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 HB-EG를 추가로 첨가한 것을 사용할 수 있다. 아울러, 필요시 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이나 성장인자 또는 분화관련 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 CO<sub>2</sub>를 유지시킬 수 있다. 배양시의 온도는 보통 20 °C 내지 45 °C, 바람직하게는 25 °C 내지 40 °C를 유지할 수 있다.
- [0038] 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.
- [0040] 본 발명의 일실시예에서는 HB-EGF에 의한 지방줄기세포의 활성화를 확인하기 위하여 HB-EGF처리 후 지방줄기세포의 증식 및 이동(migration)이 증가되는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).
- [0041] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HB-EGF처리한 지방줄기세포의 재생능력 및 노화억제능력을 확인하였다(도 4 및 도 5).
- [0042] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 털이 제거된 마우스의 등 부위에 HB-EGF로 처리한 지방줄기세포를 이식하여 모발 생성 효과를 확인하였다. 그 결과, HB-EGF로 활성화된 지방줄기세포를 이식한 그룹이 대조군에 비하여 모발이 더 빠르고 풍부하게 생성되어 더 우수한 모발 증식 효과가 있음을 알 수 있었다(도 6).
- [0044] 따라서, 본 발명은 HB-EGF를 처리하여 배양된 지방줄기세포, 또는 그 배양액을 유효성분으로 포함하는, 탈모증 예방, 치료 또는 발모 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0045] 상기 약학적 조성물은 세포 이식 용도로 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 용어 "탈모"는 모발이 완전히 두피 밖으로 빠져나오는 현상을 의미한다. 탈모가 진행되고 있는 사람은 성장기가 짧아지고 휴지기가 긴 모발 주기를 가지게 되는데, 하기 실시예에서 입증된 바와 같이 HB-EGF 처리된 지방줄기세포 또는 이의 배양액은 모발을 휴지기에서 성장기로 전환시키고, 피부조직에서 발모 및 양모와 관련된 성장인자의 발현을 증가시키는 바 탈모를 예방, 개선 또는 치료하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.
- [0047] 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.

- [0049] 구체적으로 본 발명은 HB-EGF 처리된 지방줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모증 예방, 치료 또는 발모 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 방법에 의해서 발모능이 증진된 지방 줄기세포를 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.
- [0051] 약학적으로 허용되는 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충 식염수, 슈크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 일반 의약품 제제의 형태, 예를 들어, 임상 투여 시 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0053] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 슈크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.
- [0054] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0055] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 의약 조성물은 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 적용되는 질환의 종류에 따라 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 의약 조성물은 발모촉진 또는 탈모의 예방 및 치료에 사용되기 때문에 피부에 국소적으로 적용되는 방식으로 투여되는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 발모 촉진용 의약 조성물은 국소 투여용 주사제인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 의약 조성물은 유효량의 지방줄기세포 또는 이의 배양액을 포함할 때 바람직한 탈모증 예방, 치료 또는 발모 촉진 효과를 제공할 수 있다. 본 발명에 있어서, '유효량'이라 함은 탈모증 예방, 치료 또는 발모 촉진 효과가 나타나는 조성물의 양을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 지방줄기세포 또는 이의 배양액의 유효량은 조성물이 제품화되는 형태, 상기 화합물이 피부에 적용되는 방법 및 피부에 머무르는 시간 등에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 상기 조성물이 탈모증 예방 또는 치료를 위한 의약품으로 제품화되는 경우에는 일상적으로 피부에 적용하게 되는 화장품으로 제품화되는 경우에 비해 높은 농도로 지방줄기세포 또는 이의 배양액을 포함할 수 있을 것이다.
- [0058] 또한, 본 발명의 의약 조성물 또는 치료제의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 투여 시간, 투여 경로 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 HB-EGF 처리된 지방줄기세포는 세포치료에서 적은 양의 세포를 사용하고도 동일한 발모 촉진 효과를 얻을 수 있으므로, 세포치료에 있어서 지방줄기세포의 투여량을 낮출 수 있는 효과가 있다.
- [0060] 본 발명은 또한 HB-EGF 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 HB-EGF 처리된 지방줄기세포를 의약품 조성물의 유효성분으로 사용할 경우, 탈모 예방 또는 발모 개선 효과를 나타내는 상기 지방줄기세포 또는 그 배양액을 그대로 첨가하거나, 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적

에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

- [0062] 본 발명의 탈모 예방 또는 발모 개선용 의약외품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정하지 않으며, 탈모 예방 또는 발모 촉진 효과를 나타내는 것으로 당업계에 공지된 의약외품의 형태로 다양하게 제형화될 수 있다. 상기 제형화된 의약외품은 연고제, 크림제, 겔제, 액상제, 에멀전, 패취 또는 분무제인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로 헤어토닉, 헤어로션, 헤어크림, 헤어스프레이, 헤어무스, 헤어젤, 헤어컨디셔너, 헤어샴푸, 헤어 린스, 헤어팩, 헤어트리트먼트, 눈썹발모제, 속눈썹발모제, 속눈썹영양제, 애완동물용 샴푸, 애완동물용 린스, 손 세정제, 세제, 비누, 소독청결제, 물티슈, 마스크, 연고제, 패취 또는 필터 충전제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 의약외품을 모두 포함한다.
- [0063] 또한, 각 제형에 있어서 탈모 예방 또는 발모 촉진용 의약외품 조성물은 다른 성분들을 기타 의약외품의 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.
- [0065] 본 발명은 또 다른 관점에서, HB-EGF 처리된 지방줄기세포 또는 그 배양액을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 화장품은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어영양크림, 헤어모이스처크림, 헤어맛사지크림, 헤어왁스, 헤어에어로졸, 헤어팩, 헤어영양팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 머릿기름, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어젤, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 및 헤어스프레이 등 다양한 형태로 제조될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 화장품은 유효성분이 HB-EGF 처리된 지방줄기세포 또는 이의 배양액뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일실시예에서는, 털이 제거된 마우스의 등 부위에 HB-EGF를 처리하여 모발 생성 효과를 확인하여본 결과, 대조군에 비하여 모발이 더 빠르고 풍부하게 생성되어 더 우수한 모발 증식 효과가 있음을 알 수 있었다(도 7). 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HG-EGF를 처리하여 조직 배양한 결과, 마우스 콧수염의 길이가 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 8).
- [0070] 이에, 본 발명은 HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0071] 또한, 본 발명은 HB-EGF(heparin binding EGF-like growth factor; Hb-EGF)를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0072] 약학적 조성물과 화장료 조성물에 관한 내용은 상기 기재한 내용이 동일하게 적용될 수 있다.
- [0074] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발모촉진" 또는 "탈모방지"는 당업계에서 이용되는 다른 용어 양모 또는 욱모 촉진을 포함하는 의미이다.
- [0075] 본 발명의 발모 촉진용 의약 조성물 또는 화장품이 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.
- [0076] 본 발명에서는 생후 약 7주부터 약물을 투여하여 성장기(anagen)로 유도되는 것을 비교하기 위해 C3H/HeN 마우스의 상전이 동물모델(telogen to anagen transition model)을 사용하였다.
- [0077] 본 발명의 용어 "성장기(anagen)"는 모발의 반복되는 성장주기 가운데 주기의 90% 정도를 차지하는 모발이 성장하는 단계를 말하며, "휴지기(telogen)"는 모근(hair root) 아래쪽에서 모발을 성장시키는 모구 부분의 세포 분열이 멈추고, 일시 정지되어 모발이 빠지게 되는 시기를 말한다.
- [0079] 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 지식



을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### 실시예 1

[0081] 지방조직으로부터 지방유래 줄기세포의 분리 및 배양

[0082] 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°C 인큐베이터에서 50분간 흔들어 배양하였다. 그 다음으로 상기 배양액에 PBS와  $\alpha$ -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  $\mu$ m 나일론 mesh로 걸러낸 후 원심분리하고 펠렛만을 수득하여 배지에 섞어 배양하였다. 수득된 지방줄기세포는 10% FBS(GIBCO, Invitrogen), 1% 페니실린/스트렙토마이신(GIBCO)이 포함된  $\alpha$ -MEM 배지(Hyclone, Thermo Scientific)로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 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 2

[0084] HB-EGF 처리에 의한 지방줄기세포의 증식능력 향상 효과 확인

[0085] 실시예 1에서 얻은 지방줄기세포를 현미경으로 관찰하고, 트립신으로 세포를 띄운 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.

[0086] 그 결과, [도 1]에 나타난 바와 같이, HB-EGF를 처리하여 배양한 경우 모두 대조군 대비 지방줄기세포의 증식이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

### 실시예 3

[0088] HB-EGF 처리에 의한 지방줄기세포의 이동능 향상 효과 확인

[0089] HB-EGF 처리에 따른 지방줄기세포의 이동능력 향상을 확인하기 위하여, 스크래치 분석(assay)과 트랜스웰(transwell)을 이용한 이동능력 테스트를 수행하였다.

[0090] 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 HB-EGF를 첨가한 배지로 구분하여 일정 시간 동안 관찰하고 사진을 찍어 결과를 분석하였다.

[0091] 그 결과, [도 2]에 나타난 바와 같이 지방줄기세포에 HB-EGF를 처리한 후 세포 이동 수가 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0093] 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 HB-EGF를 각각 첨가한 조성물 배지를 다시 첨가하여 2-3일동안 배양한다. 이것은 HB-EGF에 의한 분자기전을 주어 세포의 생장 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.

[0094] 그 결과 [도 3]에 나타난 바와 같이, HB-EGF 처리 후 농도 의존적으로 지방줄기세포의 이동능력이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

### 실시예 4

[0096] HB-EGF 처리에 의한 지방줄기세포의 자가 재생 효과 확인

[0097] 지방줄기세포 1 X 10<sup>4</sup> 개를 seeding하고 24시간 후 HB-EGF(5, 20ng)을 각각 처리한 후 10일 후 crystal violet

시약으로 염색하였다 10일 동안 3일 간격으로 HB-EGF를 총 3회 새로운 배지와 섞어 교체해주었다. 그 후 사진 찍고 세포의 수가 50개 이상인 콜로니의 수를 세어 도 4에 나타내었다.

[0098] 그 결과, [도 4]에 나타난 바와 같이 HB-EGF를 처리한 후 대조군 대비 지방줄기세포의 콜로니가 급격하게 증가한 것으로부터 자가 재생 효과를 확인할 수 있었다.

### 실시예 5

[0100] HB-EGF 처리에 의한 지방줄기세포의 노화억제 효과 확인

[0101] 6 well 배양접시에 6세대 지방줄기세포를  $1 \times 10^5$  농도로 접종하였다. 24시간 배양 후 HB-EGF를 각각 5, 20ng 처리하고 4일 동안 배양한 후 다시 계대를 높여가며 HB-EGF를 지속적으로 12세대까지 처리하였다. 12세대 후 X-Gal kit (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 사용하여 세포를 염색하여 분석하였다.

[0102] 그 결과, [도 5]에 나타난 바와 같이 HB-EGF를 처리하여 배양한 지방줄기세포의 노화가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

### 실시예 6

[0104] 실험동물에서 HB-EGF로 전 처리된(Pre-treatment) 지방줄기세포의 발모 효과 확인

[0110] 애완동물용 털 제모기와 제모크림을 사용해서 6주령 male C3H 쥐의 등 부분의 털을 제거한 후 5 ng의 HB-EGF가 2일 동안 처리된 지방줄기세포를 쥐 등에  $3 \times 10^4$  개씩 피하주사 하였다. 12~16일 후 쥐 등에 새로 자란 털을 밀고 무게측정을 통해서 털 재생하는 정도를 살펴보았다.

[0111] 그 결과, [도 6]에 나타난 바와 같이, HB-EGF 전 처리된 지방줄기세포를 피하 주사한 쥐에서 모발 성장기 유도가 빨라졌음을 알 수 있었다.

### 실시예 7

[0113] 실험동물에서 HB-EGF의 발모 효과 확인

[0114] 애완동물용 털 제모기와 제모크림을 사용해서 6주령 male C3H 쥐의 등 부분의 털을 제거한 후 100 ng/ml의 HB-EGF를  $100 \mu\text{l}$ 씩 쥐 등에 12일 동안 피하주사 하였다. 16일째 되는 날 면도칼을 사용하여 쥐 등에 새로 자란 털을 밀고 무게측정을 통해서 털 재생하는 정도를 살펴보았다.

[0115] 그 결과, [도 7]에 나타난 바와 같이, HB-EGF를 처리한 쥐에서 모발 성장기 유도가 빨라졌음을 알 수 있었다.

### 실시예 8

[0117] HB-EGF 처리된 배지에서 조직 배양의 효과 확인

[0118] 정상적인 생쥐의 성장기 콧수염(anagen vibrissal)을 메스와 족집게를 사용하여 분리하였다. 분리된 생쥐의 콧수염을 정량 배지(2 mM L- 글루타민, 10  $\mu\text{g}$  /ml 인슐린, 10 ng / ml 하이드로 코르티손, 페니실린과 혈청이 없는 윌리엄스 E 배지)에 HB-EGF를 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.

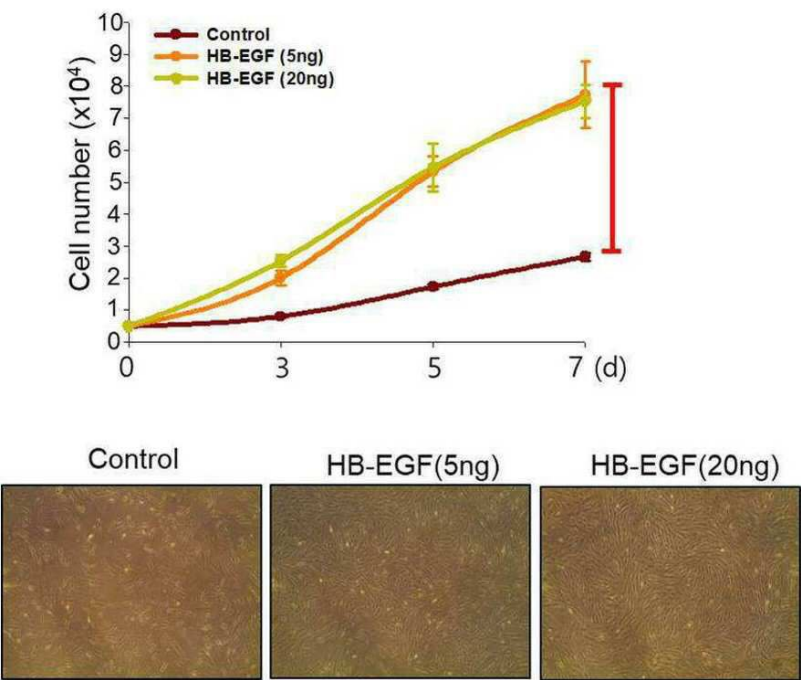
[0119] 그 결과, [도 8]에 나타난 바와 같이 대조군 보다 HB-EGF를 처리한 군에서, 분리된 생쥐의 콧수염의 길이가 증가하였다.

### 실시예 9

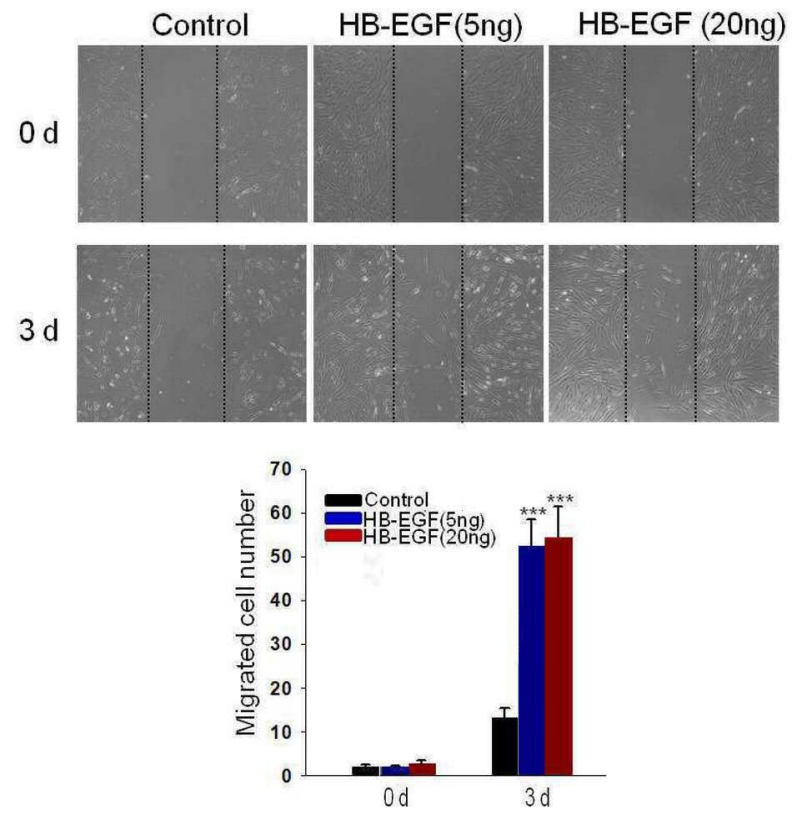
삭제

도면

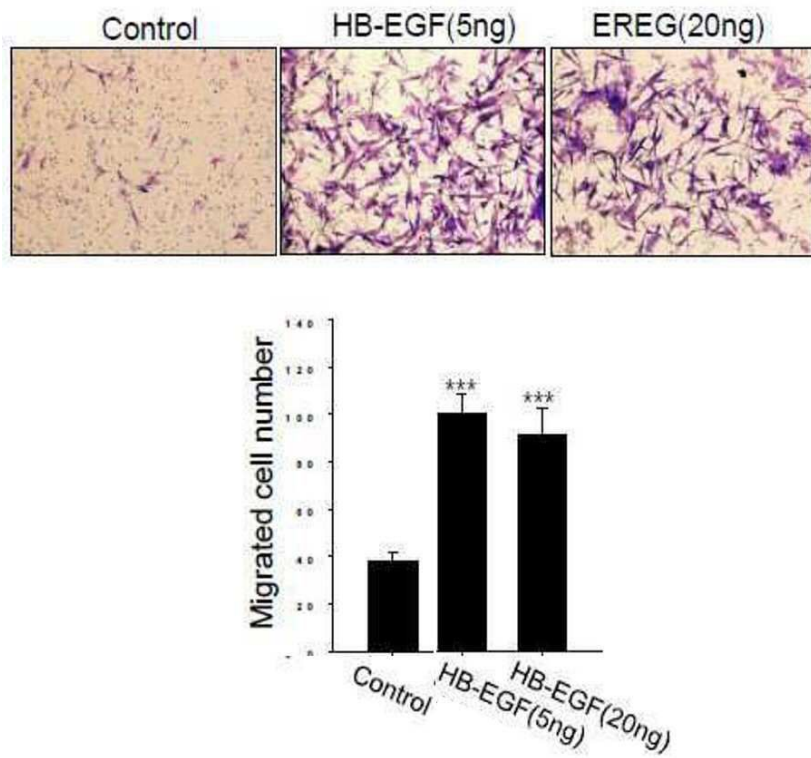
도면1



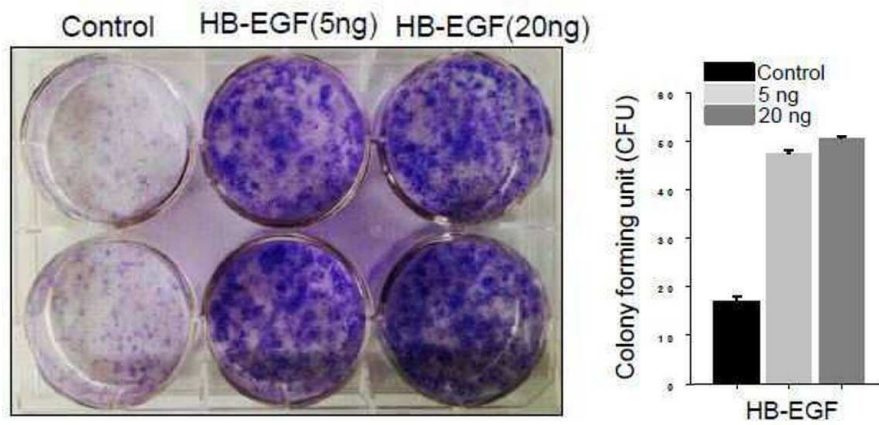
도면2



도면3

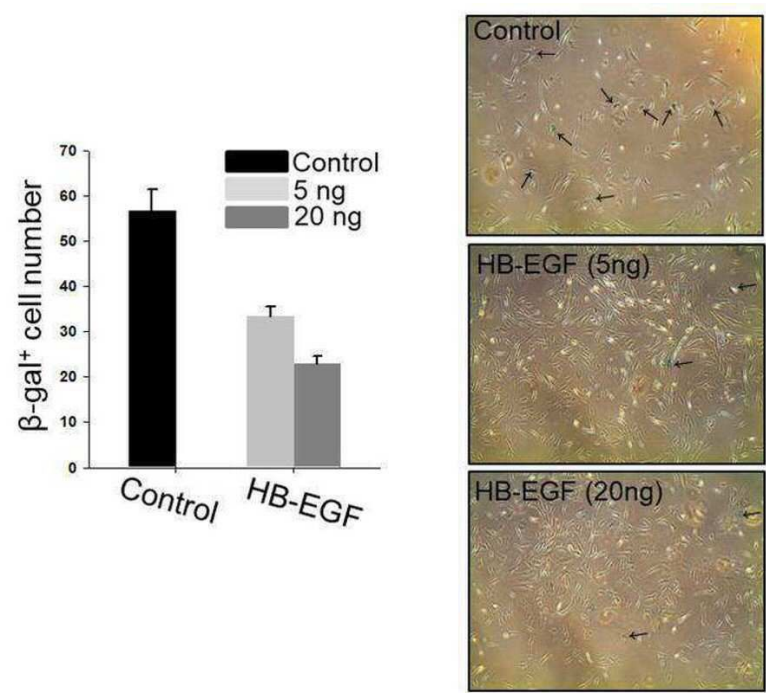


도면4

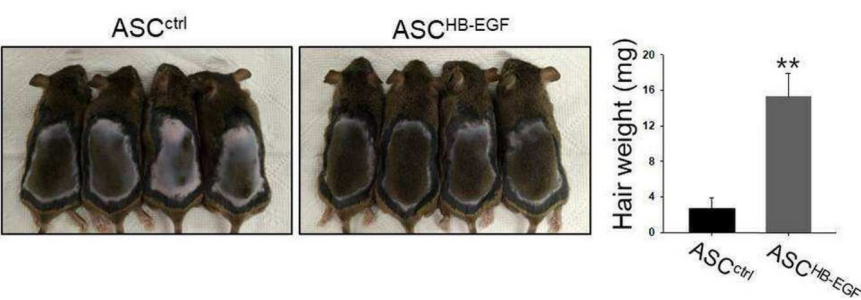


• CFU; colony including at least 50 cells

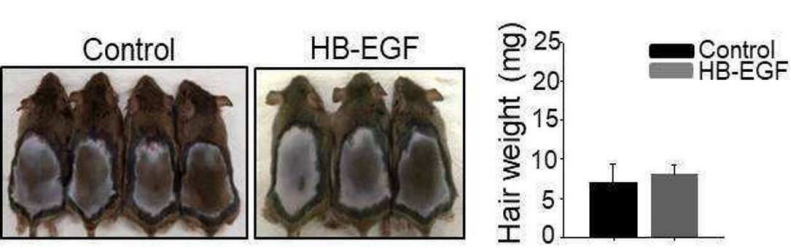
도면5



도면6

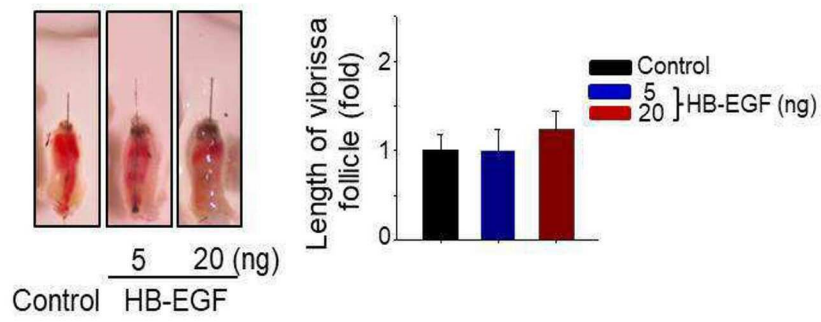


도면7





도면8



도면9

삭제