

## Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/074   C12N 5/02   A61K 35/36   A61P 17/14
Published Date	20130416
Registration No.	1012556490000
Registration Date	20130410
Application No.	1020100109602
Application Date	20101105
Unexamined Publication No.	1020110050377
Unexamined Publication Date	20110513
Priority Claims	1020090107184   20091106   KR
Requested Date of Examination	20101105
Agent.	LEECHYOYOUNG
Inventor	Ra, Jeong Chan   Kang, Sung Keun   Woo, Sang Kyu   Kim, Mi Ae   Yoon, Eun Ji
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

### 발명의 명칭

모낭 줄기세포의 대량 증식방법

### Title of Invention

The mass increase method of the follicle stem cell.

### 요약

본 발명은 높은 수율로 모낭 줄기세포를 증식시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 모낭 줄기세포 배양시 특정 농도의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가한 특정 배지를 사용하여 대량으로 모낭 줄기세포를 수득하는 방법 및 이에 사용되는 배지에 관한 것이다.

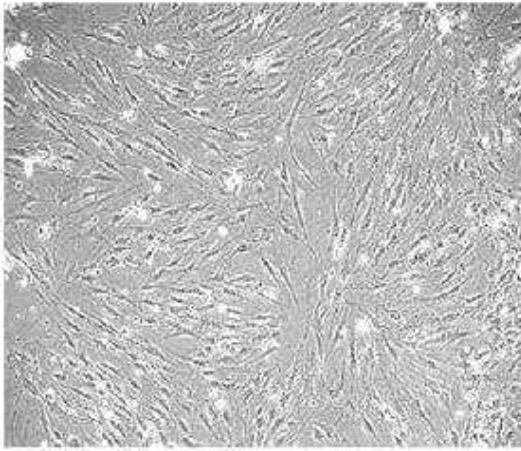
본 발명에 따른 모낭 줄기세포 배양용 배지는 두피 조직으로부터 분리된 모낭 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식시킬 수 있어, 상기 모낭 줄기세포를 탈모증 및 무모증 등을 위한 발모용 세포치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

### Abstract

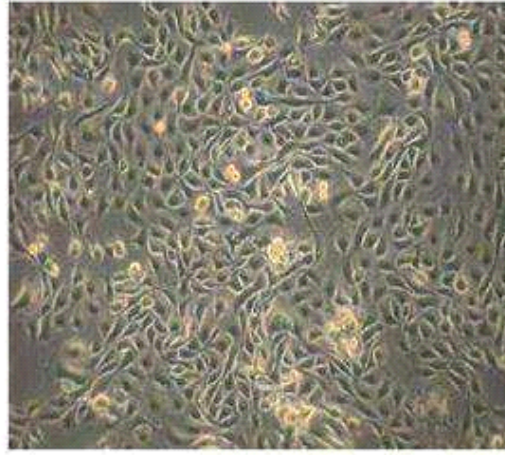
The invention relates to the method of obtaining massively, the follicle stem cell using the defined medium with the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of the specific consistency in more detailed follicle stem cell cultivation as the method of multiplying the high yield the follicle stem cell and the culture medium used therein.

It can be used as the cell therapy product for the hair growth including alopecia and atrichia the follicle stem cell etc. it can multiply in an amount of the extent applying the follicle stem cell in which the follicle stem cell culture badge according to the present invention is separated from the scalp tissue to the clinic.

### 대표도면 (Representative drawing)



**대조군**



**실험군**

**청구의 범위**

**Scope of Claims**

**청구 1항:**

기본 배지에 5 내지 50#956#M의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 1:**

The culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance containing the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of 5 through 50μM in the basal medium.

**청구 2항:**

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 ITS+ 프리믹스 (insulin, transferrin, selenious acid premix), EGF, bFGF 또는 항생제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 2:**

As for claim 1, the culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance in which the basal medium additionally contains the ITS+ premix (insulin, transferrin, selenious acid premix), EGF, and the bFGF or the antibiotic.

**청구 3항:**

제1항에 있어서, 상기 ROCK 저해제는 5 내지 20#956#M의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 3:**

As for claim 1, the culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance in which it has the ROCK inhibitor with measure it is done by the concentration of 5 through 20μM.

**청구 4항:**

제1항에 있어서, 상기 ROCK 저해제는 10#956#M의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 4:**

As for claim 1, the culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance in which it has the ROCK inhibitor with measure it is done by the concentration of 10μM.

**청구 5항:**

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12배지, MEM-alpha배지, 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지, MCDB 131 배지 및 IMEM배지로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 배지인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 5:**

As for claim 1, the culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance called the selected culture medium more than one kind in group comprised of the basal medium is the M199 / F12 culture medium, the MEM-alpha culture medium, the lightly doped is the glucose compound DMEM medium, and the MCDB 131 culture medium and IMEM culture medium.

**청구 6항:**

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12배지 또는 MEM-alpha배지인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 6:**

As for claim 1, the culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance called the basal medium is the M199 / F12 culture medium or the MEM-alpha culture medium.

**청구 7항:**

제1항에 있어서, 상기 모낭 줄기세포는 인간 두피조직 유래인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지.

**Claim 7:**

As for claim 1, the culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance called the follicle stem cell is the human scalp tissue originated.

**청구 8항:**

.

**Claim 8:**

.

**청구 9항:**

모낭 줄기세포를 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 모낭 줄기세포의 증식#183#유지 방법.

**Claim 9:**

The proliferation · keeping method for cultivating the follicle stem cell among claim 1 to claim 8 in the culture medium of any one claim of the follicle stem cell.

**청구 10항:**

제9항에 있어서, 상기 배양은 2계대 내지 6계대로 이루어지는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포의 증식#183#유지 방법.

**Claim 10:**

As for claim 9, the proliferation · keeping method of the follicle stem cell in which cultivation comprises 2 passage to 6 passage.

**청구 11항:**

제9항의 방법에 의해 수득된 모낭 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 치료용 조성물.

**Claim 11:**

The depilation therapeutic composite containing the follicle stem cell obtained with the method as an active ingredient of claim 9.

**청구 12항:**

제11항에 있어서, 상기 탈모 치료용 조성물은 지방조직 유래 줄기세포를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 탈모 치료용 조성물.

**Claim 12:**

As for claim 11, the depilation therapeutic composite in which the depilation therapeutic composite additionally contains the adipose tissue-originated stem cell.

**기술분야**

본 발명은 높은 수율로 모낭 줄기세포를 증식시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 모낭 줄기세포 배양시 특정 농도의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가한 특정 배지를 사용하여 모낭 줄기세포를 대량으로 증식시키는 방법 및 이에 사용되는 배지에 관한 것이다.

**Technical Field**

The invention relates to the method of multiplying the massively the follicle stem cell using the defined medium with the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of the specific consistency in more detailed follicle stem cell cultivation as the method of multiplying the high yield the follicle stem cell and the culture medium used therein.

**배경기술**

최근 미용에 관한 관심이 높아지면서 탈모증의 치료에 대한 관

**Background Art**

Recently, the concern toward the treatment of

심 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.

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(생장기)와 2~4주간의 퇴행기를 거쳐서 3~4개월 정도의 휴식기(휴지기)에 들어가게 된다. 각 모낭은 일생 동안 10~20회의 모낭 성장 주기(hair follicle growth cycle)를 갖게 된다.

탈모의 치료법으로 여러 가지 방법들이 소개되어 있으나 최근에 기대되고 있는 치료법으로 유전자를 이용한 치료방법을 들 수 있다. 이러한 유전자 구조를 이용하여 모낭에 직접 원하는 DNA코드를 전달하는 방법이나 유전자 발현을 차단하는 치료법이 개발되고 있다. 그러나 이러한 치료의 효능성, 치료비용, 안정성, 후대에 미칠 영향 등에 대해 아직 밝혀지지 않은 점이 너무 많고 그러므로 탈모에 관여하는 유전인자를 밝혀낸다고 하더라도, 그걸 이용한 치료방법이 안전하게 현실화되기까지는 상당한 기간이 걸린다.

한편, 성장기에 있는 모발의 구근 특성이 모발에 붙어있는 채로 적출한 다음, 그 모낭세포를 배양하고 이를 다시 적출한 부위에 이식하는 모발 재생방법이 개시된 바 있으나, 그 효과는 그다지 효율적이지 않았다.

마지막으로 줄기세포를 이용한 탈모 치료방법이 개발되고 있는데, 탈모나 화상과 같은 다른 피부 질병도 이와 마찬가지로 모낭 줄기세포의 동정과 유전자 분석과 같은 방법으로 치료의 발전을 기대할 수 있다. 표피에서의 줄기세포 개념은 30년 전부터 이미 논의되어 왔다. 모발 성장은 독특한 주기적인 재생 현상으로, 모낭 줄기 세포의 위치 및 기능은 모발 성장의 생물학 및 병리학을 모두 이해하는데 결정적인 문제이다[Oshima H. et al., Cell, 104:233-245, 2001]. 줄기 세포의 특징인, 레벨 보유 세포가 소위 모구 영역이라 불리는 모낭의 영구적인 상부 부분에 위치하는 것으로 밝혀졌다[참조: Cotsarelis G. et al., Cell, 61:1329-1337, 1990].

그러나, 이러한 모낭 줄기세포의 명확한 배양법이 확립되지 않

alopecia is moreover raised while the concern about the cosmetic effects is raised. Alopecia refers to state without the hair to the place where the place normally has to have the hair. The role is very great of the point of view called the cosmetic it does not have and besides the function including the anti-ultraviolet, the protecting human head etc. has as to the important physiological function, in which the hair is directly connected to life. In case the depilation is serious it lives socially but it can affect and the problem is important at the quality side of life.

The depilation can be classified into the scar depilation in which the wound is clinically followed and the non-scar depilation which the hair comes out. In case of the scar depilation, the hair again does not grow since the hair follicle is destroyed. While being made in the place where the hair is called the hair follicle each hair follicle periodically goes through the step of the pause and activity. It timelies of this hair cycle it is various according to the body part but the gap enters the rest period (the dormant) of about 3~4 month in the hair on one's head after the growth phase (the growing stage) of about 2~6 year and catagen of 2~4 daytime. Each hair follicle has the hair follicle growth cycle of 10~20 time for the lifetime.

The treatment method using the treatment method presenting many methods as the therapy of the depilation but recently is expected the gene can be given. The method for delivering the direct desired DNA code to the hair follicle using this gene structure or the therapy blocking the gene expression is developed. But until the treatment method using the thing the point is not yet clarified about the influence etc. reaches the effectiveness, doctors fee dragon, stability, future generations of such treatment point is so many safely comes true it takes the suitable period.

In the meantime, after it extracted while the bulb property of the hair which was in the growth phase stuck to the hair the hair regeneration method cultivating the follicular cell and transplanted this to the site which again extracted was initiated. But the effect was not particularly efficient.

Finally, the other skin disease like the depilation or the image is the power generation of the method like the identification of the follicle stem cell like this and gene analysis the treatment the treatment of fallen hair method using the stem cell is developed are expected. The stem cell concept at skin had been being already discussed before 30 year. The position of the periodic regeneration phase, that the hair growth is unique the hair follicle stem cell and function is the biology of the hair growth and pathology may be referred to the problem decisive to understand. And it was shown to be positioned in the permanent upper portion of the hair follicle [the reference: Cotsarelis G. the et al, the Cell, 61:1329-1337, 1990] which was called because the characteristic phosphorus of the stem cell, and the level holding cell was the so-called hair bulb area [Oshima H. et al., Cell, 104:233-245, 2001].

But the clear method of cultivation of this follicle stem

있고, 일부 모낭 내에 모낭 줄기세포가 존재한다는 것이 알려져 있을 지라도, 실제 사람의 대머리 치료를 위해 많은 양의 줄기세포가 필요하였으나, 아직까지 분리된 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식 시키는 기술이 미미하였다. 줄기세포의 표지 단백질도 아직까지 정확하게 확립되지 않아 줄기세포를 이용한 탈모치료방법은 여전히 미흡한 상태이다.

cell was not established. It was known that the follicle stem cell existed within the some hair follicle. So many stem cell of the amount was needed for the bald head treatment of the real person. But the technology multiplying the so far separated stem cell in an amount of the extent could apply to the clinic was sight. The stem cell the labeling protein of the stem cell is not so far accurately established may be referred to the state where the treatment of fallen hair method used is still insufficient.

이에 본 발명자들은 모낭 줄기세포의 대량 생산을 위하여 예의 노력한 결과, 특정 농도의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유한 다양한 배지실험을 통해 특정 종류의 배지에서 모낭 줄기세포를 대량으로 증식 및 유지시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, the inventors made many efforts for the mass production of the follicle stem cell. Then it confirmed to massively could maintain the follicle stem cell through various culture medium experiments containing the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of the specific consistency in the culture medium of the specific kind with proliferation. The invention was completed.

## 발명의 내용

## Summary of Invention

### 해결하고자 하는 과제

### Problem to be solved

본 발명의 목적은 모낭 줄기세포의 대량 생산용 배지를 제공하는데 있다.

This Purpose of the invention is to provide the bulk culture medium for production of the follicle stem cell.

본 발명의 다른 목적은 상기 배지를 이용하여 모낭 줄기세포를 임상에 적용 가능할 정도로 대량 증식시키는 방법을 제공하는데 있다.

It is another object of the present invention to provide the method for letting increase in quantity the follicle stem cell using the culture medium in the clinic as much as it is applicable.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 수득한 다량의 모낭 줄기세포를 유효성분으로 하는 탈모 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

It is still another object of the present invention to provide the depilation therapeutic composite having a large amount of follicle stem cell obtained by the method as the active ingredient.

### 과제 해결 수단

### Means to solve the problem

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

To accomplish the above objects, invention

기본 배지에 5~50#956#M의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식#183#유지용 배지를 제공한다. 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture), MEM-alpha배지, 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지, MCDB 131배지 및 IMEM배지로 구성된 군에서 선택되는 하나일 수 있다. 이 때, 상기 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지는 글루코오스를 약 1000mg/L농도로 함유하고 있다. 상기 배지들 중에서 특히, 바람직하게는 M199/F12(mixture)배지 또는 MEM-alpha배지이다.

The culture medium for the follicle stem cell proliferation · maintenance containing the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of 5~50μM in the basal medium is provided. The basal medium may be one selected from group comprised of the M199 / F 12 (mixture), the MEM-alpha culture medium, the lightly doped is the glucose compound DMEM medium, and the MCDB 131 culture medium and IMEM culture medium. At this time, the lightly doped the glucose compound DMEM medium is glucose is contained as about 1000mg / L concentration. Preferably the particularly is the M199 / F 12 (mixture) culture medium or the MEM-alpha culture medium among culture mediums.

상기 기본 배지는 ITS+ (insulin, transferrine, selenium) premix, EGF, bFGF 및 항생제, 예를 들어, Antibiotic-Antimycotic 등을 함유하는 것이 바람직하다.

The basal medium is the ITS+ (insulin, transferrine, selenium) premix, EGF, and the bFGF and antibiotic, for example, the Antibiotic-Antimycotic etc may be referred to the be desirable it contains.

특히, 상기 ROCK 저해제는 5~20#956#M의 농도인 것이 바람직하고, 약 10#956#M의 농도인 것이 더욱 바람직하다.

Particularly, the ROCK inhibitor may be more, the be desirable it is the concentration of about 10μM what is the concentration of 5~20μM is the be desirable.

본 발명은 또한, 상기 배지들을 이용하여, 즉, 모낭 줄기세포를, 5~50#956#M의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된, 기본 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 모낭 줄기세포의 증식#183#유지 방법을 제공한다.

The invention also provides the proliferation · keeping method for cultivating in the culture mediums in other words the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of 5~50μM the follicle stem cell-added basal medium of the follicle stem cell.

이 때, 상기 배양은 2계대 내지 6계대인 것이 바람직하고, 상기 배지는 세포 배양 2일마다 교환하는 것이 바람직하다.

At this time, cultivation may be the be desirable the culture medium exchanges at the cell culture 2 what is 2 passage to 6 passage is the be desirable.

본 발명은 또한 상기 방법에 따라 수득된 다량의 모낭 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모증 또는 무모증 치료용 세포 치료제 조성물을 제공한다. 또한, 상기 조성물은 그 분리 수득이 비교적 용이한 지방 줄기세포를 추가로 함유할 수 있다.

The invention also provides the cell pharmaceutical composition for alopecia or the atrichia treatment which it has an large amount of follicle stem cell obtained according to the method as the active ingredient it does. Moreover, relatively the composition the separation acquisition additionally can contain the easy adipose stem cell.

### 발명의 효과

### Effects of the Invention

본 발명에 따른 모낭 줄기세포 배양용 배지는 두피 조직으로부터 분리된 모낭 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식시킬 수 있어, 상기 모낭 줄기세포를 탈모증 및 무모증 등을 위한 발모용 세포치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

It can be used as the cell therapy product for the hair growth including alopecia and atrichia the follicle stem cell etc. it can multiply in an amount of the extent applying the follicle stem cell in which the follicle stem cell culture badge according to the present invention is separated from the scalp tissue to the clinic.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### Description of Embodiments

이하 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

Hereinafter, specifically it describes the invention.

줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다.

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability.

성체 줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 분화능(multipotent)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 조직 특이적 분화능을 가진 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있다.

The adult stem cell has the blastogenesis (multipotent) specializing in the cell specific for the organization and boiler in the step that each long-term of the embryo bud it is progressed it is formed or the stem cell showing up in the adult step. As the stem cell in which the stem cell (multipotent stem cell) having this tissue specific blastogenesis can specialize in the cell specific for the organization containing this cell and boiler, it engages in the function of inducing regeneration in the fetal life, and the maintenance of homeostasis of the adult tissue as well as the growth of each organization of the new-born baby and adult phase and long-term and development and tissue injury.

본 발명은 성체 줄기세포, 그 중에서도 상피 조직 유래의 모낭 줄기세포의 효과적인 배양에 관한 것이다.

The invention relates to the adult stem cell, among them, the effective cultivation of the follicle stem cell of the epithelial tissue originated.

모낭 줄기세포는, 모낭과 모낭 사이의 표피(interfollicular

The follicle stem cell comprises the stem cell existing in

epidermis)라고 불리는 표피의 기저층(the basal cell layer of epidermis)에 위치하고 있는 약 10%의 줄기세포 및 모낭(hair follicle)에 존재하는 줄기세포를 포함하며, 특히 모낭은 세포분화가 일어나기 전의 세포로 표피의 재생과 관련하여 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다.

상기 모낭 줄기세포는 인간을 포함하는 모든 포유류의 상피조직, 예를 들어, 두피조직으로부터 분리하여 사용될 수 있다. 이 때 두피조직은 모낭을 포함하여야 한다.

즉, #34#상피조직 유래 모낭 줄기 세포#34# 또는 #34#두피조직 유래 모낭 줄기세포#34#는 모낭을 포함하는 상피조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에서는 축약하여 #34#모낭 줄기세포#34#라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통해 획득할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 두피조직 유래 모낭 줄기세포를 사용하였다.

당업계에 공지된 통상의 방법 중 일례로 이하와 같은 방법을 사용할 수 있다.

두피조직으로부터 모낭 줄기세포를 분리하기 위하여 우선 두피조직을 잘게 절개한다. 그 다음, 절개된 조직으로부터 모낭조직을 하나씩 분리한다. 분리된 모낭조직을 잘게 자르고 콜라게나아제가 함유된 배지에서 1차 화학적 분해를 행한다. 이때 절개된 조직의 화학적 분해는 50-200rpm, 섭씨 30-40도에서 0.5-24시간 동안 중력대류배양기에서 행할 수 있다. 그 후 상기 화학적 분해된 조직(두피세포)을 회수하여 혈청이 포함된 배지에서 배양하여 세포들을 회수한 다음, 이 중에서 모낭 줄기세포를 분리하여 획득할 수 있다.

본 발명은 일 관점에서, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하여, 상기 모낭 줄기세포를 대량으로 증식 및 유지시킬 수 있는 배양용 배지에 관한 것이다.

본 발명에서 모낭 줄기세포의 대량 증식에 사용되는 배지는 일반적으로 세포의 배양에 이용되는 기본 배지(basal medium)일 수 있다. 본 발명에서 기본 배지(basal medium)이라는 용어는 세포가 증식할 수 있는 배지로서 간단한 조성을 가지는 것을 뜻한다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM(Minimal Essential Medium), DMEM(Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에 당해 업계에서 이용되는 배지이면 족하다.

바람직하게는 M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene),

the stem cell and the hair follicle positioned in the base layer (the basal cell layer of epidermis) of the skin called as the skin (interfollicular epidermis) between the hair follicle and the hair follicle of about 10%. And it is known as the cell before the cell differentiation especially, the hair follicle occurs that the important role is managed in connection with the regeneration of skin.

It separates from the epithelial tissue of all mammals in which the follicle stem cell includes human for example the scalp tissue and it can be used. At this time, the scalp tissue does including the hair follicle.

That is, as the divided adult stem cell separated from the " epithelial tissue originated hair follicle stem cell " or the epithelial tissue in which the " scalp tissue originated follicle stem cell " contains the hair follicle, it reduces in this specification and it names as the " follicle stem cell ". It can obtain through the normal method in which this is known in the relevant industry. In a preferred embodiment of the present invention, the human scalp tissue originated follicle stem cell was used.

For example, the method like this can be used among the normal method which is known in the relevant industry.

Firstly the scalp tissue is small pieces cut out in order to separate the follicle stem cell from the scalp tissue. Next, the hair follicle organization is one by one separated from the cut organization. The separated hair follicle organization is small pieces cut and the first chemical decomposition is performed in the culture medium in which the collagenase is contained. At this time, the cut chemical decomposition of the organization can perform in 50-200rpm, and the celsius 30-40 drawing for 0.5-24 hours in the gravity convection culture medium. Thereafter, after the chemical disassembled organization (scalp cell) is cultivated in the culture medium containing the blood serum it collects and cells are collected among these, the follicle stem cell is separated and it can obtain.

The invention relates to the follicle stem cell, massively, proliferation and the culture badge can maintain the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) is contained in consistency.

In the present invention, the culture medium used in the mass propagation of the follicle stem cell may be the basal medium used in generally, the cultivation of the cell in the present invention, the term means it is the basal medium to have the simple composition as the culture medium in which the cell can increase. Generally, it is sufficient if it is the culture medium used in the business field besides it experiences it has the MEM (Minimal Essential Medium), the DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), the RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), the K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium) to the basal medium used in cultivation.

Preferably, it can be selected in group comprised of the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO), the MEM-alpha culture

MCDB 131배지(Welgene) 및 IMEM배지(GIBCO)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 이 때, 상기 저농도 글루코오스 함유 D MEM배지는 글루코오스를 약 1000mg/L농도로 함유하고 있다. 그리고, 특히, 이 중에서 M199/F12(mixture)(GIBCO) 또는 MEM-alpha 배지(GIBCO)인 것이 더욱 바람직하다.

이 때, 상기 배지들은 ITS+ premix (insulin, transferrin, selenious acid), EGF, bFGF를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 추가로, 항생제, 예를 들어 Antibiotic-Antimycotic 등을 더 포함할 수도 있다.

ITS+ premix는 일반적으로 defined media를 구성하는 필수 요소인 insulin, transferrin, selenious acid를 함유하는 광범위 배양 보충물(culture supplement)로서 무혈청 배양상태에서 세포의 증식(proliferation)을 유도(stimulate)하는 역할을 한다. EGF(epidermal growth factor)는 수용체와의 결합을 통하여 세포의 성장, 증식, 분화를 조절(regulation)하는 기능을 담당한다. bFGF(basic fibroblast growth factor)는 angiogenesis, 상처치료 등에 관여하며 일반적으로 여러 종류의 세포들의 증식과 분화의 진행과정에 중심적인 역할을 하는 세포성장인자이다.

특히, 본 발명에서 사용하는 상기 배지들은 #34#모낭 줄기세포#34#의 배양 및 증식에 효과적이다. 통상적으로 공지된 모낭 줄기세포 배양용 배지는 DMEM 또는 K-SFM 등이 사용되고 있으나, 본 발명에서는 실시예 2를 통해서, 그 중에서도 모낭 줄기세포에 더욱 효과적인 특정 배지들을 선별하였다.

이 때, 모낭줄기세포 배양에서 상기 insulin, human transferrin, selenious acid 각각의 농도들은 0.1 ug/ml(100 ng/ml) ~ 10 ug/ml, 바람직하게는 0.1~6.25 ug/ml, 더욱 바람직하게는 0.1~1ug/ml이다. 본 발명의 일 실시예에서는 약 0.625ug/ml을 사용하였다.

상기 배지들은 5~50#956#M의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하고 있는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 5~20#956#M의 농도로, 더욱 바람직하게는 7~15#956#M의 농도로, 가장 바람직하게는 약 10#956#M의 농도로 함유되는 것이 좋다.

분리한 모낭 줄기세포를, ROCK 저해제를 첨가한 상기 배지에서 1차 배양하여 모낭 줄기세포를 회수하고, 이어서, 계대배양 시에도 계속 ROCK 저해제 존재 하에서 배양하여 모낭 줄기세포가 미분화상태를 유지하도록 할 수 있다.

ROCK 저해제 (Rho-associated kinase inhibitor)는 세포사멸(apoptosis)을억제하는 기능을 하는 물질로서, 신경돌기의

medium (GIBCO), the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Welgene), and the MCDB 131 culture medium (Welgene) and IMEM culture medium than. At this time, the lightly doped the glucose compound D MEM medium is glucose is contained as about 1000mg / L concentration. And particularly, among these, it more is the be desirable the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO) or the MEM-alpha culture medium (GIBCO).

At this time, culture mediums is the ITS+ premix (insulin, transferrin, selenious acid), EGF, and the bFGF may be referred to the be desirable it implies. Additionally, the antibiotic, and for example, the Antibiotic-Antimycotic etc further can be included.

In the serum-free culture state as the wide range cultivation complement (culture supplement) containing the insulin called the required elements in which generally the ITS+ premix organizes the defined media, the transferrin, and the selenious acid, the proliferation of the cell serves to be done the conduction (stimulate) about. The skill in which the EGF (epidermal growth factor) erupts the growth of the cell, proliferation, and the specialization through bond with the receptor with the modulation (regulation) is taken charge of. The role it centrals of the generally being in the progress of the proliferation of the cells of the various kind and differentiation while the bFGF (basic fibroblast growth factor) engages in the angiogenesis, the dressing etc may be referred to the cell growth factor done.

Particularly, in the present invention, culture mediums used are effective for cultivation and proliferation of the " follicle stem cell ". Generally, the publicly known follicle stem cell culture badge DMEM or the K-SFM etc. were used. But in the present invention, in the present invention, more effective defined mediums were among them selected through the embodiment 2 in the follicle stem cell.

At this time, the insulin in the follicle stem cell cultivation, the human transferrin, and selenious acid each concentrations may be 0.1 ug / ml (100 ng/ml) ~ 10 ug / ml, preferably, 0.1~6.25 ug / ml, more preferably, 0.1~1ug / ml. In a preferred embodiment of the present invention, about 0.625ug / ml was used.

Culture mediums contain the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) of 5~50μM. Preferably, more preferably, it as to the measure, is good to the concentration of 5~20μM it does to the concentration of 7~15μM to the concentration of about 10μM.

In the culture medium with the ROCK inhibitor the follicle stem cell separated is added, it cultivates with the first and the follicle stem cell is collected. It continuously cultivates under the presence of the ROCK inhibitor or and subsequently the follicle stem cell maintains the undivided condition in the subculture.

As the material in which the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) functions to control the a

재생, 미오신 인산화 및 평활근 수축에 있어 작용-유도성  $Ca^{2+}$  + 증감(agonist-induced  $Ca^{2+}$  sensitization)의 억제 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 보다 구체적으로, ROCK 저해제는 고혈압과 천식을 일으키는 근육 세포의 비정상적 구조를 경감시켜주는 것으로 알려져 있으며 시신경유두의 혈액 흐름을 증가시키고 안압을 지속적으로 감소시키는 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 생물학적으로는 세포의 사멸과정(Apoptosis)를 억제하고 미분화상태를 유지하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다.

본 발명에서 사용가능한 대표적인 ROCK 저해제로서는, Y-27632, HA-1077, Y-39983, Wf-536 등이 있고, 본 발명의 일 구체예에서는 그 중에서 Y-27632(Calbiochem 또는 Sigma)를 사용하였다. Y-27632(Calbiochem 또는 Sigma)의 구조식은 하기와 같다.

본 발명에 사용할 수 있는 ROCK 저해제의적정 처리농도는 5~50 $\mu$ M고, 바람직하게는 5~20 $\mu$ M, 더욱 바람직하게는 약 10 $\mu$ M이다. 5 $\mu$ M 미만의 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 모낭 줄기세포의 미분화능이 장기간 유지되기 어려우며, 50 $\mu$ M 초과 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 세포의 변형이 일어나고 분화단계로 접어드는 현상이 발생할 수 있다.

특히, 모낭 줄기세포에 ROCK 저해제를 상기 농도로 처리한 경우, 증식된 모낭 줄기세포는 장기간 동안형태학적으로도, 기능적으로도 건강한 상태로 유지된다.

본 발명은 다른 관점에서, 상기 배지를 이용하여 모낭 줄기세포를 대량으로 증식 및 유지시키는 방법에 관한 것이다. 즉, 수득된 모낭 줄기세포를, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 상기 특정 배지에서 계대배양하는 것을 특징으로 하는, 모낭 줄기세포 증식#183#유지 방법에 관한 것이다.

상기 모낭 줄기세포 증식#183#유지방법에 있어서, 배지에 관한 설명은 앞서 기술한 바와 같다.

특히, 상기 배양은 2계대 ~ 6계대인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 2계대로 배양한다. 그리고, 상기 배지는 세포 배양 2일마다 교환하는 것이 바람직하다. 계대 배양을 통해 모낭 줄기세포의 세포수를 증가시킴에 있어서, 임상에 효과적이기 위해서는, 계대 배양 기간동안 기능적으로도 형태학적으로도 세포의 변형이 용이하게 이루어지지 않아야 하는데, 특정 농도의 ROCK 저해제 함유 및 특정 배지 성분의 함유는 이러한 기능적 또는 형태학적 세포 변형을 막아주는 기능을 한다.

ptosis, it is known that it functions as to the regeneration of the nurite, and the myosin phosphorylation and smooth-muscle contraction of the suppression of the action - inductiveness  $Ca^{2+}$  sensitization (agonist-induced  $Ca^{2+}$  sensitization) etc. More specifically, the structure is known that the structure is known that it abnormal of the muscular cell in which the ROCK inhibitor causes hypertension and asthma the structure is reduced and the structure has and the structure has the function of increasing the blood flow of the optic disk and continuously reducing the ocular pressure. Moreover, the of biologically controlling the death process (Apoptosis) of the cell and maintaining the undivided condition function is known that it has the function.

In the present invention, as the usable and representative ROCK inhibitor, it had Y-27632, HA-1077, Y-39983, the Wf-536 etc. The Y-27632 (the Calbiochem or the Sigma) was among them used in one embodiment of the present invention. The structural formula of the Y-27632 (the Calbiochem or the Sigma) does it is the same.

The ROCK inhibitor used in the present invention may be preferably, 5~20 $\mu$ M, more preferably, about 10 $\mu$ M it is 5~50 $\mu$ M. In case of processing the ROCK inhibitor as the concentration less than 5 $\mu$ M it is difficult that the long term the U.S. blastogenesis of the follicle stem cell is maintained. And the phenomenon that the deformation of the cell occurs in case of processing the ROCK inhibitor as 50 $\mu$ M excess density and enters the specialization step can be generated.

Particularly, in case the ROCK inhibitor is processed as the concentration in the follicle stem cell the proliferated follicle stem cell is maintained by the functionally healthy state for the long term through the morphologically.

The invention relates to the method of massively maintaining with proliferation the follicle stem cell using the culture medium in the other point of view. That is, about the follicle stem cell proliferation - keeping method for subculturing in the ROCK inhibitor (Rho-associated kinase inhibitor) the obtained follicle stem cell-added defined medium.

As to the follicle stem cell proliferation - keeping method, the description about the culture medium is before the same as that.

Particularly, cultivation is 2 passage ~ 6 passage. And preferably it cultivates to 2 passage. And the culture medium may be the desirable it exchanges at the cell culture 2. The cell number of the follicle stem cell is increased through the subculture. It effectiveness it takes good care of two periods in the clinic. The deformation of the cell should not be functionally easily morphologically made for the subculture period. It functionals it morphologicals the ROCK inhibitor containing of the specific consistency and containing of the specific medium com

ponent function to protect the cell modification.

본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법에 의해 대량으로 수득한 모낭 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 또는 무모증치료제; 및 탈모증 또는 무모증 치료방법에 관한 것이다. 보다 바람직하게는, 모낭 줄기세포뿐만 아니라, 지방 줄기세포를 함께 함유할 수 있다. 지방 줄기세포는 당해업계에 공지된 방법으로 얻을 수 있으며, 일례로, 지방조직을 세척한 후, 콜라게나제 등으로 분해하여 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 남은 지방줄기세포를 혈청배지에 하룻밤 이상 배양하는 방법으로 수득할 수 있다.

The invention relates to and, the hair growth induction cell therapy product containing the follicle stem cell obtained by the massively with the method as an active ingredient in the other point of view, the minoxidil or the atrichia therapeutic agent, and alopecia or the atrichia a treatment method. More preferably, the adipose stem cell not only the follicle stem cell, can be together contained. It can obtain by the method of cultivating in the serum medium over one night the adipose stem cell it removes.

#39#발모유도#39#는 탈모 부위 또는 무모 부위에 모낭을 형성하여 털이 나도록 유도하는 능력을 말한다.

The ' hair growth conduction ' refers to the depilated area or the capability which it induces so that it forms the hair follicle on the rashness site and the hair grow.

#39#치료하는#39#이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, #39#치료#39#란 용어는 #39#치료하는#39#이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서, 포유 동물에 있어서 질환의 #34#치료#34# 또는 #34#치료요법#34# 은 하기의 하나 이상을 포함한다:

The term is not differently mentioned with 39. It cures with ' at least one symptom of the disease in which the term corresponds or the disease or the disease or the disease is reversed or it relieves or the progressing is controlled or at least one symptom means to prevent. As shown in it is used in the present application the term refers the action which it cures with ' cured when being defined with 39 to the ' treatment '. Therefore, the " treatment " of the disease as to the mammal or the " therapy " comprises below one or greater:

- (1) 해당 질환의 성장을 저해함,
- (2) 질환의 확산을 예방함,
- (3) 질환을 경감시킴,
- (4) 질환의 재발을 예방함, 및
- (5) 질환의 증상을 완화함(palliating)

- (1) The growth of the corresponding disease is hindered.
- (2) The diffusion of the disease is prevented.
- (3) The disease is reduced.
- (4) The recurrence of the disease is prevented.
- (5) The symptom of the disease is relieved

탈모증 또는 무모증을 치료하기 위해, 본 발명의 조성물을 약리학적 유효량으로 투여한다.

In order that alopecia or the atrichia is cured the composition of the present invention is administered to the therapeutically effective amount.

#39#약리학적 유효량(therapeutically effective amount) #39#은 투여되는 화합물의 양이 치료하는 장애의 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감하는 것을 의미한다. 따라서, 약리학적 유효량은, (1) 질환의 진행 속도를 역전시키거나 (2) 질환의 그 이상의 진행을 어느 정도 금지시키게 하는 것을 의미하며, (3) 질환과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감(바람직하게는, 제거)하는 효과를 가지는 량을 의미한다.

It means to to some extent reduce the symptom of one or more of the failure which the amount of the compound in which the ' therapeutically effective amount ' is injected cures. Therefore, it reverses the progress speed of (1) disease (2) or it means amount having the effect that means to to some extent forbid and to some extent plays the symptom of one or more associated with (3) disease the reduction (preferably, the removal) the progressing described in the above of the disease.

본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 또는 국부 투여 등을 포함하는 비경구 투여가 바람직하고, 보다 바람직하게는 피하 투여 또는 국부투여를 이용하여 투여할 수 있으며, 주로 탈모 또는 발모를 필요로 하는 부위에 직접 주입

The parenteral administration including the hair growth induction cell therapy product of the present invention, and the minoxidil and atrichia therapeutic agent is the intravenous administration, intraperitoneal administration, intramuscular medication, subcutaneous administration,

하는 방법으로 투여할 수 있다.

주사를 위해서, 바람직하게는 Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리 식염수 버퍼와같은 약리학적으로 맞는 버퍼로 제형될 수 있다. 점막 투과 투여를 위해서, 통과할 배리어에 적합한 비침투성제가 제형에 사용된다. 그러한 비침투성제들은 당업계에 일반적으로 공지되어 있다.

비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 소위 #39#대머리#39#로 인식되는 전형적인 남성형 탈모 및 폐경 또는 난소제거 수술 후 발생할 수 있는 여성형 탈모증에 대한 치료를 위하여 두피에 적용할 수 있을 뿐만 아니라 발모를 필요로 하는 신체 부위라면 어디나 적용할 수 있다. 예를 들면, 외상으로 인한 흉터로 모발이 손상된 부위, 또는 단순 미용효과를 목적으로 하는 넓은 이마 또는 M형 이마, 속눈썹 또는 눈썹 및 무모증의 상태 호전에도 사용할 수 있다.

본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th<sup>ed.</sup>, 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는

on or the local administration etc is the be desirable. More preferably, it can administer using the subcutaneous administration or the local administration. And it can administer to the site which mainly requires the depilation or the hair growth to the direct method for injecting.

It can be preferably formed for injection to the buffer fitting due to the Hank-HEPES, and the pharmacological such as the Ringer solution and saline solution buffer. The impervious agent which is suitable for the barrier passing for the mucous membrane penetration administration may be used in the formulation. As the generally that impervious agents are known in the relevant industry.

The agent for the parenteral administration includes the sterilized aqueous solution, the non-aqueous solvent, the suspension agent, the emulsion etc. The propylene glycol, the polyethylene glycol, the vegetable oil like the olive oil, the ester like the ethyl oleate etc. can be used as the non-aqueous solvent, and the suspension solvent it can scan.

If it is the body part which can affect the scalp for the treatment about the feminine alopecia which can be generated after the hair growth induction cell therapy product of the present invention, and the minoxidil and the typical male pattern alopecia in which the atrichia therapeutic agent is recognized as the so-called ' baldness ' and menopause or the ovary exclusion operation requires the hair growth it can apply as the where. For example, the site or the basic beauty effect in which the hair is damaged to the scar due to the debit can be used in the intended the wide forehead or the mucoid form forehead, and the favorable turn of state of the eyelashes or the eyebrow and atrichia.

The hair growth induction cell therapy product of the present invention, and the lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, starch, gum acacia, calcium phosphate, alginate, gelatin, calcium silicate, fine crystallization property cellulose, polyvinyl pyrrolidone, cellulose, water, syrup, methylcellulose, methylhydroxybenzoate, propyl hydroxy benzoate, talc, magnesium stearate and mineral oil etc. generally the minoxidil and the pharmaceutically acceptable carrier included in the atrichia therapeutic agent are used in the agent are included. But it is not thus restricted.

The hair growth induction cell therapy product of the present invention, and the minoxidil and atrichia therapeutic agent is the lubricant, wetting agent, emulsifier, suspension agent, the preserver etc besides components can be further. The suitable pharmaceutically acceptable carrier and the agent are particularly entered in the Remington's Pharmaceutical Sciences (19th<sup>(sup)</sup>ed (/sup)., 1995).

According to the hair growth induction cell therapy product of the present invention, and the minoxidil and the method which the atrichia therapeutic agent an or

담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 발모유도 약물요법 또는 수술요법 등과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하였을 경우 극대화된 효능을 나타낼 수 있다.

사람의 경우, 세포치료제의 통상적인 투여량은  $10^4 \sim 10^{10}$  cells/body, 바람직하게는  $10^6 \sim 10^8$  cells/body, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은  $1 \times 10^8$  cells/body 내지  $1 \times 10^9$  cells/body 인 것이 바람직하다.

그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

이하 실시한 실시예에서 사용한 각종 배지 및 시약의 입수처는 하기 표에 기재된 바와 같다.

### 도면에 대한 간단한 설명

도 1은 내지 도 5는 9종류의 배지에서 모낭 줄기세포 배양 상태를 나타내는 사진이다.

도 6 및 도 7은 ROCK 저해제의 농도별 모낭 줄기세포 증식능 향상 효율을 비교한 결과이다.

도 8은 M199/F12배지에 대하여 시판 중인 조성 그대로 사용한 경우와 ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic 함유시킨 경우의 모낭 줄기세포 증식능 향상 효율을 비교한 결과이다.

ordinary person skilled in the art easily can perform, by becoming using the pharmaceutically acceptable carrier and/or the diluting agent with formulation the unit dosage form is manufactured with the unit dosage form or it inserts within the multiple dose container and it can be manufactured. And the dispersing agent or the stabilizer is include might additionally.

The hair growth induction cell therapy product of the present invention, and the minoxidil and atrichia therapeutic agent exhibit the effect which can be used as the single therapy and but it can be used with the other conventional hair growth induced medicine therapy or the operative therapy etc. and becomes maximized in case of performing this combination therapy.

In case of human, preferably it divides into  $10^6 \sim 10^8$  cells / body, 1 time or the several occasions and the conventional amount of administration of the cell therapy product can administer with  $10^4 \sim 10^{10}$  cells / body. Particularly, the composition of the present invention may be the be desirable it is  $1 \times 10^8$  cells / body to  $1 \times 10^9$  cells / body.

But the different related element has to be understood that the disease, the administration route, the age of the patient, and sex, weight and severe disease of the disease which the actual dose of the active ingredient cures light to the different related element of the etc. and it has to be determined. And therefore the amount of administration does not limit the scope of the present invention through any method.

Hereinafter, the invention tries to be more particularly explained through the embodiment. These embodiments only exemplify the invention. Therefore it has to a person skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry not to be interpreted that the scope of the present invention is limited by these embodiments.

Hereinafter, the place of acquisition of all kinds of the culture mediums and the reagent used in the embodiment performed are same as those of as described in the diagram below.

### Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph showing the inland drawing 5 is the follicle stem cell culture state at the culture medium of 9 kind.

Figures 6 and 7 are the result comparing the concentration follicle stem cell reproductive integrity improvement efficiency of the ROCK inhibitor.

Figure 8 is a result comparing the follicle stem cell reproductive integrity improvement efficiency of in that case, it includes as much as case and the ITS+ premix, wh

도 9는 디하이드로테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시딜, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(0~14주)로 탈모 상태를 나타낸 그래프이다.

도 10은 디하이드로테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시딜, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(6~14주)로 탈모 상태를 촬영한 사진이다.

도 11은 테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시딜, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(0~16주)로 탈모 상태를 나타낸 그래프이다.

도 12는 테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시딜, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(6~16주)로 탈모 상태를 촬영한 사진이다.

도 13은 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 투여하여 주 단위(0~6주; 투여 시를 0주로 하였음)로 탈모 상태를 촬영한 사진이다.

ich it like that uses against the M199 / F12 culture medium with the commercially available composition EGF, and the bFGF and Antibiotic-Antimycotic.

Figure 9 is graph showing the weekly unit (0~14 weeks) the depilation state the saline solution, 3% minoxidil, the follicle stem cell, the adipose stem cell, the follicle stem cell / adipose stem cell (the parallel use) is injected into the mouse inducing the depilation using the dihydrotestosterone.

Figure 10 is a photograph injecting the saline solution, 3% minoxidil, the follicle stem cell, the adipose stem cell, the follicle stem cell / adipose stem cell (the parallel use) into the mouse and takes a photograph the depilation state with the weekly unit (6~14 weeks) inducing the depilation using the dihydrotestosterone.

Figure 11 is graph showing the weekly unit (0~16 weeks) the depilation state the saline solution, 3% minoxidil, the follicle stem cell, the adipose stem cell, the follicle stem cell / adipose stem cell (the parallel use) is injected into the mouse inducing the depilation using testosterone.

Figure 12 is a photograph injecting the saline solution, 3% minoxidil, the follicle stem cell, the adipose stem cell, the follicle stem cell / adipose stem cell (the parallel use) into the mouse and takes a photograph the depilation state with the weekly unit (6~16 weeks) inducing the depilation using testosterone.

Figure 13 is a photograph administering the follicle stem cell / adipose stem cell (the parallel use) and taking a photograph the depilation state with the weekly unit (0~6 weeks: administration time was decided on to 0 weeks).

## 실시예

### 모낭 줄기세포의 분리

두피유래 조직(모발이식센터, 한국)을 세절한 다음, 콜라게나아제 타입 A1가 함유된 배지(L/G DMEM(Welgene, Korea) 및 2 mg/ml의 콜라게나아제 타입 A1(Gibco, USA)이 첨가된 배지)에 넣어 100 rpm, 37도에서 30~50분 동안 중력대류배양기에서 화학적 분해가 이루어지도록 하였다.

화학적 분해된 조직을 원심분리로 수거하여 DPBS로 세척한 다음, M199/F12 혈청배지(1:1의 M199 및 F12, 0.1 X ITS premix, 20 ng/ml의 rEGF(Gibco, USA), 10 ng/ml의 bFGF(Gibco, USA), 1 X Antibiotic-antimycotic, 10% 우태아혈청(Gibco, USA) 첨가한 배지)에서 조직 및 세포배양을 하였다. 0.1X ITS+ premix 에는 0.625ug/ml insulin, 0.625ug/ml transferrin, 0.625ug/ml selenious acid, 0.535ug/ml linoleic acid가 포함되어 있다.

약 3일 후부터 조직들이 배양용기 바닥에 부착되기 시작하면, M199/F12 무혈청 배지로 교체하여 배양하고(PO), 부착되지 않은 조직은 다시 수거하여 M199/F12 혈청배지(1:1의 M199 및 F12, 0.1 X ITS premix, 20 ng/ml의 rEGF(Gibco, US

## Example(s)

The treatment of fallen hair in vivo confirmation using stem cell.

4- 1: the confirmation of the treatment of fallen hair using mouse model.

In the present invention, in order that it confirmed using the follicle stem cell cultivated in the organism whether the treatment of fallen hair in fact efficiently the treatment of fallen hair was attempted using the stem cell.

It administered to the androchronogecetic alopecia (B6CBAF1/j) mouse called the android type depilation animal model the follicle stem cell obtained in the embodiment 1. Moreover, the dihydrotestosterone 6 daytime 0

A), 10 ng/ml의 bFGF(Gibco, USA), 1 X Antibiotic-antimycotic, 10% 우태아혈청(Gibco, USA) 첨가한 배지)에서 3일간 2차 배양을 개시하고 POT1으로 명명하였다. 이후로 PO 세포는 2일마다 새로운 배지를 공급하였고, POT1은 3일이 지난 후 M199/F-12 무혈청배지로 교체하였다. POT1에서도 볼지 않은 조직은 다시 수거하여 POT2로 명명하여 다시 배양하였다. 동일한 과정으로 PO, POT1 조직/세포들은 2일마다 새로운 배지를 공급하였고, POT2는 3일 후 M199/F-12 무혈청배지로 교체하여 지속적으로 배양하였다. 이로써 모낭 줄기세포를 분리하였다.

r testosterone was done about with 8 daytime hypodermic injection (2 mg / task) and the depilation the testin g material was administered to 12 age female B6CBAF1 hybrid mice (female C57BL/6 male CBA) after doing the induction.

## ROCK 저해제를 함유하는 다양한 배지별 모낭 줄기세포의 배양 효율

The test group divided into 5 totals group like the next. And 10 numbers the total 50 numbers per group was used for the experiment.

### 2-1: 분리된 모낭 상피줄기세포의 배양

우선, 상기 실시예 1에서 수득한 모낭 줄기세포에 대하여 총 세 [Test group] 포수 및 세포 생존율을 확인하였다.

PO :  $1.33 \times 10^6$  (91%)

그 후, 12 well palte를 준비한 후, ITS+ (insulin, transferrine, selenium) premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 함유하고 있는, 이하의 9종류의 배지 종류별로 각 웰당 1ml씩 대조군과 실험군 2개씩 분주하였다. 각 실험군에 ROCK 저해제 Y-27632를 농도 10#956#M, 10 $\mu$ l씩 첨가 배양하였다.

그 후, 2일, 3일, 4일째에 각각의 배지에서 모낭 줄기세포의 증식 상태를 관찰하고, 그 결과를 도 1 내지 도 5에 나타내었다.

도 1 내지 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 9종의 배지들 M199/F-12, MEM-alpha, DMEM L/G, DMEM H/G, MCDB 131, IMDM, DMEM/F-12, RPMI 1640, MCDB 153 중에서, M199/F12배지, MEM-alpha배지, DMEM L/G, DMEM H/G, MCDB 131배지 및 IMEM배지에서 모낭 줄기세포의 우수한 증식이 가능함을 확인 할 수 있었다.

그리고, 특히 ROCK 저해제의 효능과 관련하여서도, 대조군과 비교하여 ROCK 저해제를 함유하는 M199/F12배지, MEM-alpha배지, DMEM L/G, DMEM H/G, MCDB 131배지 및 IMEM 배지가 모낭 줄기세포의 증식 효과가 좋고, 그 중에서도 M199/F12배지, MEM-alpha배지가 가장 우수한 효과를 나타내었다.

즉, ROCK 저해제를 함유한 특정 배지는 모낭 줄기세포의 세포 수 증대 및 세포 생존율에 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었다.

### 2-2: ROCK 저해제 농도별 모낭 줄기세포 증식능 비교

1.Negative control group(saline)

2.Positive control group(3% Minoxidil)

3.Follicle stem cell single giving medication group (hHFSC)

4.Adipose stem cell single giving medication group (hASC)

5.Adipose stem cell / follicle stem cell coadministration group(hASC/hHFSC)

Androgen injected hypodermic after the depilation induction of the test substance dosage whether or not for the examination period in the experimental animals.

The depilation state which processed dihydrotestosterone called the androgen in the experimental animals or the testosterone and caused evaluated using the grading system (0-4 step the division (or category), refer to table 3) 2 weeks.

ROCK 저해제의 농도에 따른 모낭 줄기세포의 증식능을 확인하기 위하여, ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 함유하는 M199/F-12 배지에 이하 농도별로 ROCK 저해제를 첨가하여, 실시예 1에서 수득한 모낭 줄기세포를 배양하였다.

실시예 1에서 사용했던, M199/F-12에 ROCK 저해제 10#956#M를 첨가하여 배양한 P1 모낭 줄기세포를, TrypLE-Express처리하여 회수한 후  $7.70 \times 10^5$  cells을 수득하고, 6-well 플레이트를 준비하여 각 웰 마다 M199/F-12 2ml를 분주하였다.

상기 세포 현탁액 6-well 플레이트에 균등하게 플레이팅한 후, 대조군을 제외한 5개의 웰에 ROCK 저해제 Y-27632를 각각 10nM, 100nM, 1#956#M, 10#956#M, 100#956#M의 농도로 첨가하여 모낭 줄기세포를 배양하였다. 세포 배양 2일마다 배지를 교환하였고, 세포 배양 2, 3, 4, 5, 6일째 세포 사진을 촬영하였다.

그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

도 6 및 도 7에서 확인되는 바와 같이, 100nM 농도 이하의 ROCK 저해제를 처리한 경우는 ROCK 저해제를 처리하지 않은 세포의 증식도와 큰 차이가 없었고, 1#956#M 농도 또는 100#956#M에서는 세포의 증식이 향상되는 것은 확인되지만 세포변형이 일어나거나 분화 되는 현상이 나타나므로, 결론적으로 ROCK 저해제의 가장 바람직한 농도는 약 10#956#M인 것으로 확인되었다.

Index	Symptom
0	Depilation none
1	Inside regio scapularis(the intrascapular area)Hair loss
2	The hair loss of about 1cm <sup>2</sup>
3	The hair loss of about 2cm <sup>2</sup>
4	The hair loss more than 4cm <sup>2</sup>

After processing the particular alopecia could not be observed to 4 weeks. And the hair could become more slender from 5 weeks in the dihydrotestosterone process group and the pinfeather and the depilated mode can be observed in the back region. In the testosterone process group, the depilation was slower induced than the dihydrotestosterone process group and alopecia could be observed from about 7 weeks after.

Therefore, the dihydrotestosterone process group administered the testing material from 7 park. And the testosterone process group administered the testing material from 9 park. The result was shown in the figures 9 through 12.

As shown in figures 9 and 10, in case of the dihydrotestosterone process group, the depilation state could observe that the depilation state of the group administering testing material (the adipose stem cell singleness, and the follicle stem cell singleness or the adipose stem cell / follicle stem cell coadministration) or the positive control (Minoxidil) from the test substance dosage 1-2 weeks after was the state that was extraordinarily excellent than the negative control group. 8 park observation result after the test substance dosage initiation, and the depilation restraint effect of the adipose stem cell singleness or the follicle stem cell single injection exhibit the positive control (Minoxidil) and the depilation restraint effect equivalent and which is excellent in case of the adipose stem cell / follicle stem cell coadministration group than the positive control group as well as the negative control group.

Moreover, as shown in figures 11 and 12, the tendency that the hair loss is improved in the group processing testosterone from the test substance dosage initiation 2 park in case of testing material treatment group (the adipose stem cell singleness, and the follicle stem cell singleness or the adipose stem cell / follicle stem cell coadministration) whereas the negative control group is the phase in which about depilation becomes severe are shown. And in especially, 4 park after the test substance dosage initiation, the mode in which the depilation index grade of the adipose stem cell / follicle stem cell coadministration group showing the clear depilation drastically got better was observed. In 10 park after the test substance dosage initiation, the depilation restraint effect by the adipose stem cell singleness and follicle stem cell singleness treatment showed to be vastly different than the positive control (Minoxidil).

## 배지 구성성분의 특징

모낭 줄기세포에 적합한 배지 조성을 찾기 위하여, 시중에 판매되고 있는 M199/F-12 배지에 대하여 기존 조성 그대로 사용하는 경우를 대조군으로 하고, 상기 M199/F-12 배지에 ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 첨가하여 사용한 경우를 실험군으로 하여 모낭 줄기세포의 증식능을 비교하였다.

실시에 1에서 수득한 모낭 줄기세포를 각 대조군 및 실험군에서 배양하여, 4일째 되는 날, 그 증식상태를 관찰하였다.

그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, 기존의 M199/F-12 배지 성분 자체로 모낭 줄기세포를 배양한 경우, 모낭 줄기세포의 증식률이 낮았을 뿐만 아니라, 형태의 변형이 심하게 일어났다. 이에 반하여, ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 첨가한 M199/F-12 배지에서 배양한 경우에는, 모낭 줄기세포의 형태도 온전하게 보존되고 있을 뿐만 아니라, 현저한 증식률을 나타내었다.

상기 결과를 통해, 모낭 줄기세포의 증식에 있어서, 배양 배지의 종류뿐만 아니라, 이에 첨가되는 특정 인자 역시 모낭 줄기세포의 증식에 큰 영향을 끼치는 요소임을 알 수 있었다.

## 줄기세포를 이용한 탈모 치료 invivo 확인

### 4-1: 마우스 모델을 이용한 탈모 치료의 확인

Therefore, when the obtained follicle stem cell was used in the culture medium of the embodiment 1 it confirmed to be similar with the affirmation control group or it was excellent the depilation lesion be interrupted or cured. And it is suggestive that through the administration of the follicular cell in which this result has the excellent reproductive integrity of the present invention the effective curing of the corresponding disease is possible.

4- 2: the confirmation of the treatment of fallen hair effect according to the stem cell parallel use.

The separation and acquisition as to the adipose stem cell, of the originated was very facilitated to the adipose tissue. And the method for increasing and maintaining was widely known. And in order to ascertain the effect in case of using jointly with the follicle stem cell in which the acquisition was not a bit facilitated and using in the treatment of the depilation disease the lower part experiment was performed.

The therapeutic effect was confirmed as the method of the embodiment 4-1 after inducing the depilation disease through the mouse. The dihydrotestosterone the clear depilation mode could be observed in 12 age female B6CBAF1 hybrid mice (female C57BL/6 male CBA) in 6 daytime hypodermic injection (2 mg/day) one result, and both sides thigh area and plagula site.

Thus, the adipose stem cell and follicle stem cell were by turns administered to the side thigh area 3-4 with (adipose stem cell 1 time + follicle stem cell 1 time / 1 week) total 6 daytime as long as it was the depilated area. The android type hormone was hypodermic injected everyday in the experimental animals thereafter even while the observation was continued. The photograph of the mouse administered with 6 daytime was filmed and the photograph showed for fig. 13.

As shown in Figure 13, the mode in which one part hair grew in the unaided eye examination result, and the plagula depilated area could be observed after the stem cell administration 1 week the recovery mode was insignificant in the site or the other depilated area administering the cell but but the mode in which the hair more grew in the plagula depilated area could be observed after the stem cell administration 2 week in the observation. And the depilation of any more was not proceeded in both sides thigh area and the treatment of the depilation disease could be confirmed.

When the adipose stem cell in which the separation and acquisition were more easy was used jointly with the follicle stem cell and it used in the treatment in case

e of the depilation disease in which it was necessary to have many stem cell of the amount it confirmed to be similar with the case of administering only the follicle stem cell or it was excellent the depilation lesion be interrupted or cured. And when it uses jointly with the follicular cell in which this result has the excellent reproductive integrity of the present invention and the adipose stem cell is administered it is suggestive that the effective curing of the corresponding disease is possible.

본 발명에서 배양한 모낭 줄기세포를 이용하여 생체 내에서 실제로 효율적으로 탈모 치료가 되는지 여부를 확인하기 위하여, 줄기세포를 이용하여 탈모 치료를 시도하였다.

The specific part of the invention content was particularly described to the or more. And the or more has to a person skilled in the art of the relevant industry. It is the embodiment which this concrete technology only does with desirable. And it will be clear that the scope of the present invention is not limited by this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.

실시에 1에서 수득한 모낭 줄기세포를 남성형 탈모 동물 모델인 Androchronogegetic alopecia(B6CBAF1/j) 마우스에 투여하였다. 또한, 보다 상세하게는, 12주령 female B6CBAF1 hybrid mice (female C57BL/6 male CBA)에 dihydrotestosterone을 6주간 또는 testosterone을 8주간 피하 주사(2 mg/일) 하여 탈모를 유발한 후 시험물질을 투여하였다.

시험군은 다음과 같이 총 5개 군으로 나누었으며, 군당 10 마리씩 총 50 마리를 실험에 이용하였다.

[시험군]

1. 음성대조군(saline)
2. 양성대조군(3% Minoxidil)
3. 모낭줄기세포 단독 투여군 (hHFSC)
4. 지방줄기세포 단독 투여군 (hASC)
5. 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용 투여군 (hASC/hHFSC)

남성 호르몬은 탈모 유발 후에도 시험물질 투여 여부와 관계없이 시험기간 내내 실험동물에 피하주사 하였다.

실험동물에 남성 호르몬인 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone) 또는 테스토스테론(testosterone)을 처리하여 유발한 탈모 상태는 grading system (0-4단계로 구분, 표 3 참조)을 사용하여 2주 간격으로 평가하였다.

처리한 후 4주까지는 별다른 탈모현상을 관찰할 수 없었으며, 5주부터 dihydrotestosterone 처리군에서 모발이 가늘어지고 등부위에 솜털 및 탈모가 되는 양상을 관찰할 수 있었다. testosterone 처리군에서는 dihydrotestosterone 처리군보다 탈모가 늦게 유도되어 약 7주 이후부터 탈모현상을 관찰할

수 있었다.

따라서, 디하이드로테스토스테론 처리군은 7주차부터 시험물질을 투여하였으며, 테스토스테론 처리군은 9주차부터 시험물질을 각각 투여하였다. 그 결과를 도 9 내지 도 12에 나타내었다.

도 9 및 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 디하이드로테스토스테론 처리군의 경우, 시험물질 투여 1-2주 후부터 시험물질(지방줄기세포 단독, 모낭줄기세포 단독 또는 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용투여) 또는 양성대조(Minoxidil)을 투여한 군의 탈모 상태가 음성대조군보다 월등히 양호한 상태임을 관찰할 수 있었다. 시험물질 투여 개시 후 8 주차 관찰 결과, 지방줄기세포 단독 또는 모낭줄기세포 단독 투여의 탈모 억제 효과는 양성대조(Minoxidil)와 동등하였으며 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용 투여군의 경우 음성대조군은 물론 양성대조군보다도 양호한 탈모 억제 효과를 나타내었다.

또한, 도 11 및 도 12에서 알 수 있는 바와 같이, 테스토스테론을 처리한 그룹에서도 시험물질 투여 개시 2주차부터 음성대조군은 탈모 정도가 심해지는 양상인데 반해 시험물질 처리군(지방줄기세포 단독, 모낭줄기세포 단독 또는 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용투여)의 경우 탈모 증상이 호전되는 경향을 나타냈으며, 특히 시험물질 투여 개시 후 4주차에서는 뚜렷한 탈모를 보였던 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용 투여군의 탈모 진행 정도가 급격히 호전되는 양상이 관찰되었다. 시험물질 투여 개시 후 10 주차에서는 지방줄기세포 단독 및 모낭줄기세포 단독 처치에 의한 탈모 억제 효과가 양성대조(Minoxidil) 보다 월등함을 나타내었다.

이로써, 실시예 1의 배지에서 수득한 모낭 줄기세포를 이용할 경우, 긍정대조군과 비슷하거나 뛰어나게 탈모병변이 저지되거나 치료됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 본 발명의 뛰어난 증식능을 가진 모낭세포의 투여를 통해 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.

#### 4-2: 줄기세포 병용에 따른 탈모 치료 효능의 확인

지방 줄기세포는 그 유래가 지방 조직으로, 그 분리와 수득이 매우 용이하며, 증식 및 유지하는 방법도 널리 알려져 있는 바, 다소 수득이 용이하지 않는 모낭 줄기세포와 병용하여 탈모 질환의 치료 시에 사용하였을 경우 그 효능을 확인하기 위해 아래 실험을 수행하였다.

실시예 4-1의 방법으로 마우스를 통하여 탈모질환을 유도한 후 그 치료 효과를 확인하였다. 12주령 female B6CBAF1 hybrid mice (female C57BL/6 male CBA)에 dihydrotestosterone을 6주간 피하 주사 (2 mg/day) 한 결과, 양쪽 허벅지 부위와 배쪽 부위에서 뚜렷한 탈모양상을 관찰할 수 있었다.

이에 탈모부위인 한 쪽 허벅지 부위에 지방줄기세포와 모낭줄기세포를 3-4일 간격으로 번갈아가며 (지방줄기세포 1회 + 모낭줄기세포 1회 / 1주일) 총 6주간 투여하였다. 시험물질 투여 기간 및 그 이후 관찰이 계속되는 동안에도 매일 남성형 호르몬을 실험 동물에 피하 주사하였다. 6주간 투여한 마우스의 사진을 찍어 도 13에 나타내었다.

도 13에서 알 수 있는 바와 같이, 줄기세포 투여 1주일 후에 육안적 관찰 결과, 배쪽 탈모 부위에 일부분 탈이 자라는 양상을 관찰할 수 있었다. 그러나 세포를 투여한 부위나 다른 탈모 부위에서는 그 호전 양상이 미미하였다. 그러나, 줄기세포 투여 2주일 후 관찰 시에, 배쪽 탈모 부위에서 탈이 더 자라는 양상을 관찰할 수 있었으며, 양쪽 허벅지 부위에서는 더 이상의 탈모가 진행되지 않아 탈모질환의 치료를 확인할 수 있었다.

그 치료에 많은 양의 줄기세포가 필요한 탈모질환의 경우, 보다 그 분리와 수득이 쉬운 지방 줄기세포를 모낭 줄기세포와 병용하여 사용할 경우, 모낭 줄기세포만을 투여하는 경우와 비슷하거나 뛰어나게 탈모병변이 저지되거나 치료됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 본 발명의 뛰어난 증식능을 가진 모낭세포와 병용하여 지방 줄기세포를 투여할 경우, 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.

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

## 면책안내

---

본 문서는 특허 및 과학기술문헌 전용의 첨단 자동번역 시스템을 이용해 생성되었습니다. 따라서 부분적으로 오역의 가능성이 있으며, 본 문서를 자격을 갖춘 전문 번역가에 의한 번역물을 대신하는 것으로 이용되어서는 안 됩니다. 시스템 및 네트워크의 특성때문에 발생한 오역과 부분 누락, 데이터의 불일치 등에 대하여 본원은 법적 책임을 지지 않습니다. 본 문서는 당사의 사전 동의 없이 권한이 없는 일반 대중을 위해 DB 및 시스템에 저장되어 재생, 복사, 배포될 수 없음을 알려드립니다.

(The document produced by using the high-tech machine translation system for the patent and science & technology literature. Therefore, the document can include the mistranslation, and it should not be used as a translation by a professional translator. We hold no legal liability for inconsistency of mistranslation, partial omission, and data generated by feature of system and network. We would like to inform you that the document cannot be regenerated, copied, and distributed by being stored in DB and system for unauthorized general public without our consent.)