



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월07일
(11) 등록번호 10-0827252
(24) 등록일자 2008년04월28일

(51) Int. Cl.

A61K 8/98 (2006.01) A61Q 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0036632

(22) 출원일자 2007년04월13일

심사청구일자 2007년04월30일

(56) 선행기술조사문헌

KR100771171 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 알앤엘바이오

서울 관악구 봉천동 1596-7

(72) 발명자

라정찬

경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을SK.
한화아파트 626-701

정미경

경기 부천시 원미구 중2동 꿈마을아파트 1007동
904호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김범수

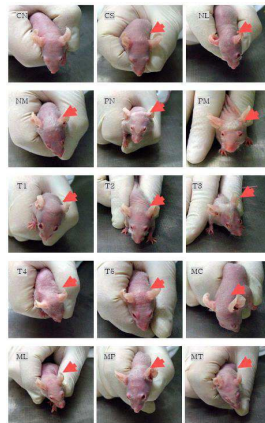
(54) 자가모양세포를 이용한 발모촉진제 및 그 조성물

(57) 요약

본 발명은 CD34에 대해 양성 또는 음성의 면역학적 특성의 두피조직 유래 세포에 의한 발모유도능을 가진 세포 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성 세포를 일정 혼합비율로 함유하는 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제에 관한 것이다.

본 발명에 따라 얻어진 발모유도용 세포 조성물은 발모촉진을 위한 새로운 세포치료제로써 매우 유용하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이성훈

경기 광명시 철산3동 472-31번지 102호

이근영

경기 가평군 설악면 방일2리 443-2번지

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포가 1:2의 비율로 함유되어 있는 발모용 세포조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제4항의 발모용 세포조성물을 유효성분으로 함유하는 탈모치료제.

청구항 8

삭제

청구항 9

제4항의 발모용 세포조성물을 유효성분으로 함유하는 무모증치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <5> 본 발명은 CD34에 대해 양성 또는 음성의 면역학적 특성의 두피조직 유래 세포에 의한 발모유도능을 가진 세포 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 일정 혼합비율로 함유하는 발모유도능 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증 치료제에 관한 것이다.
- <6> 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(Passchier J. *et al.*, *Dermatology*, 197:217, 1998; McDonagh, A.J. and Messenger, A.G., *Dermatol Clin.*, 14:661, 1996).
- <7> 탈모는 임상적으로 상처가 동반되는 반흔성 탈모와 모발만 빠지는 비반흔성 탈모로 나뉠 수 있다. 반흔성 탈모의 경우 모낭이 파괴되므로 모발이 다시 나지 않는다. 모발은 모낭이라고 하는 곳에서 만들어지며 각 모낭은 주기적으로 활동과 정지의 단계를 거치게 된다(McDonagh, A.J. and Messenger, A.G., *Dermatol Clin.*, 14:661,

1996). 이러한 모발 주기의 시간적 간격은 신체 부위에 따라 다양한 데 머리털의 경우에는 26년 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(Cotsarelis, G., *et al.*, *Cell*, 29;61:1329, 1990).

<8> 정상인의 경우 머리털의 수는 약 10만개 정도이며, 하루에 자라는 길이는 평균 0.37 mm 정도 된다(한 달에 약 1cm 정도 성장). 보통의 경우 머리털의 85~90%는 성장기에 있고 나이를 먹음에 따라 성장기 모낭의 수가 감소한다. 따라서 10~15%의 모낭이 퇴행기나 휴지기에 있으며, 하루 평균 50~60여 개 정도의 머리털이 정상적으로 빠지며 하루 100개 이상 빠지면 탈모증을 의심해야 한다.

<9> 탈모의 원인에는 첫 번째로 남성호르몬의 일종인 DHT(다이하이드로테스토스테론)이 모낭에 영향을 주어 단백질 합성 저하와 모낭에 직접 손상을 주어 탈모가 발생한다는 설과 남성호르몬(Testosterone)이 세포내에 있는 수용체인 5 α -리덕타아제(환원효소)와 결합하여 활동하는데 그 산물인 DHT(다이하이드로테스토스테론)이 DNA전사 과정에서 모낭에 영향, 즉 단백질 합성저해, 모낭의 손상등으로 탈모가 발생한다는 남성호르몬 영향설이 있다. 두 번째로는 탈모 유전자를 받아 남성호르몬의 영향에 의해 발생한다는 것과 탈모증 자체는 유전이 아니고, 탈모가 되기쉬운 체질을 조상으로부터 유전 받는다는 유전적 탈모설이 있으며 세 번째로는 스트레스로 인한 탈모설 네 번째로는 두피는 20세 전후까지 두개골은 30세 전 후까지 발달하는데, 이로 인해 두피가 얇아지고, 혈류장애가 원인이 되어 탈모가 된다는 두개골 발달로 인한 탈모설, 마지막으로 노화에 의해 탈모가 발생한다는 설 등 여러 가지 원인이 있는 것으로 보고되고 있다(Sheen, M., *Fighting Hair Loss*, USA Library Publishing, Inc. p. cm. 97-090157, 1966).

<10> 탈모의 치료법으로 여러 가지 방법들이 소개되어 있으나 현재 가장 많이 쓰이고 있는 수술 방법은 자기 자신의 머리털을 이용하여 이식하는 자가모발이식(자기모발이식)이다. 이는 1930년대에 최초로 등장하여 1950년대 미국에 소개된 이후로 꾸준한 발전을 거듭하였다. 또한 과거 15년 사이에 북미와 특히 불란서를 중심으로 한 유럽에서 대머리 치료를 위한 다양한 모발이식, 두피 피관술 및 탈모부의 두피 축소술 등이 널리 시행되고 있다(Okuda, S., *Jpn J Dermatol*, 46:135, 1939).

<11> 그리고 약물치료로는 현재 먹는 약 프로페시아와 바르는 약 미녹시딜 두 가지만 미국 식품안전청(FDA)에서 인정받았다. 탈모 예방 및 치료 효과는 미녹시딜의 경우 20 ~ 30%정도에서, 프로페시아의 경우 60 ~ 70% 정도에서 효과를 나타낸다고 보고되어 있다. 프로페시아는 1997년 하반기에 남성형 탈모 치료용으로 승인을 받았다. 이 프로페시아는 피나스테라이드라는 물질이 1 mg이 함유되어 있으며 이는 제 2형 5 α -리덕타아제(환원효소)를 억제하는 물질이다. 이 효소는 테스토스테론(남성호르몬)과 만나면 탈모를 유발하는 DHT(다이하이드로테스토스테론)으로 변한다. 따라서 이 효소를 억제하면 탈모 인자인 DHT호르몬으로 인한 것을 억제할 수 있다. 임상시험평가에서 복용한 남성의 66%가 모발의 뚜렷한 재성장이 일어난 것으로 확인되었다. 하지만 이러한 치료효과는 투여할 당시에는 그 약효가 유효하지만 약의 복용이 중단되면 몇 달 후 약을 먹기 이전의 상태처럼 탈모가 다시 진행된다(Bouhanna, P., *Dermatol Surg.*, 29:1130, 2003; Thiboutot, D., *Arch Dermatol.*, 135:1417, 1999). 그리고 미녹시딜은 1997년 하반기에 남성형 탈모 치료용으로 최초 승인을 받은 바르는 약물이다. 남녀 모두에서 사용이 가능한 탈모 치료제로써 처음에는 고혈압 환자의 치료제로 사용되었지만 그 부작용으로 머리가 나는 것이 밝혀져 탈모 치료제로 사용되었다. 사용 후 2 ~ 3개월 이후부터 효과가 나타나며 초기에는 머리카락이 더 빠지는 경우도 있지만 시간이 지나면서 개선된다(Bouhanna P., *Dermatol Surg.*, 29:1130, 2003; Messenger, A.G. and Rundegren J., *Br J Dermatol.*, 150:186, 2004). 하지만 이러한 약물치료는 성기능 장애등 많은 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다(Messenger, A.G. and Rundegren J., *Br J Dermatol.*, 150:186, 2004).

<12> 최근에 기대되고 있는 치료방법으로 유전자를 이용한 치료방법을 들 수 있다. 1998년 1월 미국 콜롬비아대학의 안젤라 크리스티아노(Angela Christiano) 박사는 전신적으로 탈모가 일어나는 질환에 관여하는 유전인자를 발견하여 발표함으로써 탈모의 유전자 치료의 새로운 장을 열었다(Ahmad W., *et al.*, *Science* 30;279:720, 1998). 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, 탈모에 관여하는 유전인자를 밝혀낸다고 하더라도, 그걸 이용한 치료방법이 안전하게 현실화되기까지는 상당한 기간이 걸릴 것 같다.

<13> 한편, 성장기에 있는 모발의 구근이 모발에 붙어있는 상태로 적출한 다음, 그 모낭세포를 배양하고 이를 다시 적출한 부위에 이식하는 모발 재생방법이 개시된 바 있으나, 그 효과는 그다지 효율적이지 않은 것으로 간주된다(미국특허공보 제 6,399,057호).

<14> 마지막으로 줄기세포를 이용한 탈모 치료방법이 개발되고 있는데, 줄기세포는 크게 네 가지의 방법으로 얻을 수 있다. 그 첫째는 배아의 발생과정중 배반포기에 내부세포괴를 추출하여 키우는 방법, 둘째는 태아의 생식세포를 이용하는 방법이고, 세 번째는 돌리와 같이 체세포의 핵을 제거한 난자에 집어넣어 배반포기를 만들어 내부세포괴를 얻는 방법으로, 이들 방법은 초기의 배나 태아 및 난자를 이용하는 방법이다. 네 번째 방법으로는 성인의 몸에서 줄기세포를 얻는 방법이다. 즉, 고전적인 방법인 골수세포를 추출하는 것과 같이 뇌를 포함한 자기재생 능력이 있는 성인 장기의 일부조직으로부터 성체 줄기세포를 추출하는 방법이고, 제대혈 까지도 성체줄기세포로 규정지을 수 있다. 즉 성체줄기세포는 '성체로부터 얻어질 수 있는 자기재생가능(self-renewal)하고 자기유지기능(self-maintenance) 및 다분화능을 보이는 성체의 모든 장기로부터 추출된 세포'로 정의된다. 지금까지 넓은 범위의 임상에서 성체줄기세포의 성격과 응용되고 있다. 예를 들면 안구 안쪽에 각막 상피 줄기세포의 동정은 새로운 각막이식의 기술의 발전을 낳았고, 조혈모세포의 특징으로 자가조직의 부분적인 줄기세포 이식과 유전자 치료의 결과를 가져왔다(Cotsarelis, G. *et al.*, *Cell* 57, 201, 1989; Tsai, R.J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 343, 86,2000; Bernstein, I.D. *et al.*, *Blood Cells*, 20:15, 1994). 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(Potten, C.S., *Cell Tiss Kinet*, 7: 77, 1974). 최근 세포 배양 연구를 기초로 한 시험관내 연구(Barrandon Y, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 2303, 1987; Rochat, A., *et al.*, *Cell*, 76:1063, 1994)들과 마우스에서의 생체 내 연구의 결과들은 표피층의 소낭 내 특정 부위(at specific locations in the interfollicular epidermis)와 모낭의 외부 모근초의 윗부분(in the upper regions of the outer root sheath of the hair follicle), 즉 돌출부분(bulge region)이라고 불리는 곳과, 성장기 모낭의 배아기질에 포함된 유사 줄기세포들과 함께 피부 줄기세포의 다소 더 복잡한 분포와 유기적 구조를 제안해 왔다(Al-Barwari, S.E. *et al.*, *Intl J Radiat Biol*, 30: 201, 1976; Morris, R.J. *et al.*, *Cancer Res* 46:3061, 1986; Cotsarelis, G. *et al.*, *Cell*, 61: 1329, 1990; Lavker, R.M. *et al.*, *J Invest Derm*, 101:16, 1993; Morris, R.J., Potten C.S., *J Invest Derm*, 112:470, 1999; Blanpain, C. *et al.*, *Cell*, 3:118:635, 2004).

<15> 이 분할된 세 부분 피부 줄기세포들 사이의 상호연관성에 대해서는 모낭 돌출부분(bulge region)이 궁극적인 줄기세포의 가장 핵심적인 부분이라고 생각되어지고 있다. 또한 이 모낭 돌출부분(bulge region)에서의 모낭 줄기세포는 CD34 세포표면 단백질을 발현하는 것으로 보고되었고 이 CD34 발현한 세포는 줄기세포의 성격을 가지고 있는 것으로 확인되었다(Trempey, C.S. *et al.*, *J Invest Dermatol*, 120:501, 2003).

<16> 하지만 모낭줄기세포의 명확한 배양법이 확립되지 않았고, 모낭줄기세포의 표식인자가 불분명하였다. 또한, 일부 모낭 내에 모낭줄기세포가 존재한다는 것이 알려져 있을 지라도, 실제 사람의 대머리 치료를 위해 많은 양의 줄기세포가 필요하였으나, 아직까지 분리된 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식시키는 기술이 미미하였다. 줄기세포의 표지 단백질도 아직까지 정확하게 확립되지 않아 줄기세포를 이용한 탈모치료방법은 여전히 미흡한 상태이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<17> 이에 본 발명자들은 모낭세포를 이용한 새로운 발모유도 및 탈모치료방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 두피 조직을 시험관에서 배양하고, 상피 조직에서 유래된 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 분리한 다음, 상피 두 가지 세포를 일정비로 혼합하여 동물실험으로 발모효능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

<18> 본 발명의 목적은 두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 일정 혼합비율로 함유하는 발모유도용 세포 조성물을 제공하는데 있다.

<19> 본 발명의 다른 목적은 상피 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제 및 무모증치료제를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

<20> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 일정 혼합비율로 함유하는 발모유도용 세포 조성물을 제공한다.

<21> 본 발명은 상피 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제 및 무모증치료제를 제공한다.

- <22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <23> 본 발명은 일 관점에서, 두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 유효성분으로 함유하는 발모유도용 세포 조성물에 관한 것이다.
- <24> 본 발명의 'CD34 양성세포'와 'CD34 음성세포'중에는 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정 세포로의 분화능을 갖는 줄기세포가 포함되어 있으며, 유래에 상관없이 본 발명에 적용할 수 있다. 줄기세포는 배아의 발생과정 중에 배반포기의 내부 세포괴에서 추출할 수 있으며 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력이 있는 배아 유래 줄기세포, 및 성체의 특정 조직에서 추출할 수 있으며 특정 유래조직으로 분화될 수 있는 능력을 갖는 한계를 가진 성체줄기세포, 이 두 가지로 나눌 수 있는데 후자의 경우에는 모든 조직에서 얻을 수 있으며, 특히 골수, 혈액, 간, 피부, 장, 췌장, 뇌, 골격근 및 치수로부터 주로 분리할 수 있다. 이 때, 본 발명에서의 발모유도에 적용하기 위해서는 모낭을 포함하는 두피에서 분리된 성체 줄기세포인 것이 바람직하며, 자가 두피유래 성체 줄기세포인 것이 보다 바람직하다. 그러나 본 발명은 CD34 양성과 CD34 음성인 세포들과 그것들을 일정비율로 혼합한 세포들의 발모능을 비교 분석하여 발모유도 조성물로서 확립하고자 하는 것이다.
- <25> 본 발명은 다른 관점에서, CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제 및 무모증치료제에 관한 것이다.
- <26> 본 발명에서 '발모유도'는 탈모 부위 또는 무모 부위에 모낭을 형성하여 털이 나도록 유도하는 능력을 말한다.
- <27> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제는 CD34 양성세포 및 음성세포가 혼합된 상태로 제조하는 것이 바람직하다.
- <28> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제에 함유되는 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포는 일정비로 서로 혼합되어야 최대의 발모유도효능을 나타낼 수 있다. 따라서 상기 두 종의 세포의 혼합비율은 1:1 내지 1:50일 수 있으며, 바람직하게는 1:1 내지 1:25, 보다 바람직하게는 1:1 내지 1:15, 가장 바람직하게는 1:1 내지 1:10일 수 있다. 일 회 투여량은 1일 당 $10^4 \sim 10^8$ 개의 세포를 함유하도록 할 수 있으나, 상기의 양은 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있으며, 투여자의 탈모상태 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 처방될 수 있다. 또한, 투여 횟수는 일 회 또는 피험자의 상태에 따라 수 회 투여할 수 있다.
- <29> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 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 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있으며, 주로 탈모 또는 발모를 필요로 하는 부위에 직접 주입하는 방법으로 투여할 수 있다.
- <30> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제는 소위 '대머리'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.
- <31> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 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 한정되는 것은 아니다.
- <32> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 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 ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- <33> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 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.

<34> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제는 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 발모 유도 약물요법 또는 수술요법 등과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하였을 경우 극대화된 효능을 나타낼 수 있다.

<35> 본 발명의 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제와 함께 이용될 수 있는 약물제제는 피나스테라이드(Finasteride), 두타스테라이드, 싸이옥톨(Cyoctol) 및 RU58841를 포함하는 남성 호르몬 또는 DHT 유발 억제제, 부갑상선 호르몬(PTH) 억제제, 미녹시딜, 버셀린(Burserelein), 혈액순환 개선제 및 메소테라피에 응용되는 조성물 등을 들 수 있으며, 수술요법으로는 모발이식, 두피 피관술, 두피 축소술 등을 들 수 있다.

<36> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<37> **실시예1: 두피조직유래 모낭세포의 배양**

<38> 두피유래 조직을 세절한 다음, 콜라게나아제 타입 IA가 함유된 배지(10% 우태아혈청(Gibco, USA), 100 unit의 페니실린, 0.1 mg/ml의 스트렙토마이신, 0.25 µg/ml의 네오마이신(Gibco, USA), 100 µg/ml의 노르모신(Invivogen, USA)이 함유된 DMEM(Gibco, USA) 및 2 mg/ml의 콜라게나아제 타입 IA(Sigma, USA)이 첨가된 배지에 넣어 130 m/min, 37°C에 30분 동안 중력대류배양기에서 화학적 분해가 이루어지도록 하였다. 화학적 분해된 조직을 원심분리로 수거하여 PBS로 3번 세척한 다음, M199/F12 혈청배지(1:1의 M199 및 F12, 0.62 µg/ml의 인슐린(Sigma, USA), 0.62 µg/ml의 트랜스페린(Gibco, USA), 100 unit의 페니실린, 0.1 mg/ml의 스트렙토마이신, 0.25 µg/ml의 네오마이신(Gibco, USA), 10 ng/ml의 rEGF(Sigma, USA), 10 ng/ml의 bFGF(Sigma, USA), 100 µg/ml의 노르모신(Invivogen, USA), 10% 우태아혈청 및 1mM의 N-아세틸-L-시스테인(Sigma, USA)를 첨가한 배지)에서 조직배양을 하였다. 약 3일 후부터 조직들이 배양용기 바닥에 부착되기 시작하면, M199/F12 무혈청 배지로 교체하여 일주일동안 배양하고, 노르모신이 없는 케라티노사이트 무혈청 배지(0.2 mM 아스코르빈산(Sigma, USA)을 첨가한 Defined keratinocytes 무혈청 액상배지(Gibco cat# 10785-012, USA)로 교체하여 배양하여 배양용기에 부착되는 성질에 따라서 세포1(배양 초기부터 세포배양용기 바닥에 부착된 세포군), 세포2(1세대 이후부터 부착된 세포군), 세포3(부유세포군)으로 각각 명명하였다.

<39> **실시예2: MACS를 통한 두피조직유래 모낭세포의 분류**

<40> 상용화 되어있는 MACS(Magnetic Cell Sorting, Miltenyi Biotec Inc., Germany)를 이용하여 CD34 양성세포를 분리하였다. 실시예1에서 얻어진 세포를 수거하여 세척한 다음, 배지를 첨가하여 피펫팅으로 단일세포로 부유시키고 150 ~ 300 µl MACS 버퍼와 50 ~ 100 µl 블로킹 리전트, 50 ~ 100 µl 마이크로 비드를 순서대로 첨가하였다. 상기 혼합액을 제조하는 과정은 암상태에서 수행하였으며, 혼합액이 담긴 튜브는 알루미늄 호일로 싸고, 4°C에서 30분 내지 4시간동안 반응시켰다. 그 후에 알루미늄 호일을 벗기고 혼합액의 약 10배 부피의 MACS 버퍼를 튜브에 추가하고 피펫으로 잘 섞어준 후 1200 rpm에서 5 ~ 6분간 원심분리하고, 상층액은 제거하였다. 500 µl MACS 버퍼를 세포의 수에 맞게 첨가한 다음, CD34 양성세포와 CD34 음성세포를 제조사가 권장하는 방법에 따라 MACS를 사용하여 분리하였다. 이때 수거된 CD34 양성세포의 세포수는 약 1 ~ 2 x 10⁷이었으며, 멸균생리식염수 100µl에 재부유시켜 추후의 동물실험에 사용하였다.

<41> **실시예3: 두피조직유래 모낭세포의 탈모치료 효과**

<42> 6주령의 수컷 BALB/cAnNCrjBgi-nu 누드마우스((주)중앙실험동물)에 1 X 10⁵ 개의 CD34 양성세포를 피하 주사하였다. 투여하기 전 대조군을 사진을 찍어 시간이 지난 후의 마우스의 상태변화와 비교하였다. 본 실험에 사용된 67마리의 누드마우스는 서울대학교 수의과대학 실험동물사육실 내 SPF 구역에서 사육하였으며, 무작위법으로 각각 5마리씩이 포함되도록 군을 분리하여 실험을 수행하였다. 시험군의 구성은 아래 표와 같다 (표 1).

표 1

그룹		세포수	마리수
대조군	무처치(CS)	NA	5
	식염수투여(CN)	NA	5
CD34양성 단독투여군	저용량(NL)	1X 10 ⁴	5
	중용량(NM)	1X 10 ⁵	5

CD34음성 단독투여군	저용량(PL)	1X 10 ⁴	5
	중용량(PM)	1X 10 ⁵	5
CD34양성/CD34음성 혼합투여군	2:1(T1)	6.6X10 ⁴ : 3.3X10 ⁴	5
	1:1(T2)	5X10 ⁴ : 5X10 ⁴	5
	1:2(T3)	3.3X10 ⁴ : 6.6X10 ⁴	5
	1:4(T4)	2X10 ⁴ : 8X10 ⁴	5
	1:8(T5)	1.1X10 ⁴ : 8.8X10 ⁴	5

<44> 또한, 상용되는 탈모치료제 미녹시딜(Minoxidil, Pfizer, USA)를 배양된 세포와 병합 사용하여 발모효과를 평가하기 위해 각 군당 3마리의 마우스가 포함되도록 하여 표 1과 대비되는 실험군을 편성하였다 (표 2).

표 2

그룹		세포수	마리수
미녹시딜 대조군(MC)		NA	3
미녹시딜 처치군	CD34양성 단독투여군(MP)	1X 10 ⁵	3
	CD34음성 단독투여군(MN)	1X 10 ⁵	3
	CD34양성/CD34음성 혼합투여군(MT)	5X10 ⁴ : 5X10 ⁴	3

<46> 상기 실험군에 모낭세포를 투여하기 하루 전 칼슘티오글라이코레이트(Sigma, USA)로 실험동물의 잔털들을 제거했고 투여한 후 30일 동안 실험동물의 두피를 관찰하였다. 매일 발모 유도 점수를 구분하여 기록하였고, 실험 시작 전과 종료시점에 동물의 체중을 측정하고, 실험 종료 후 31일째에 부검을 실시하였다.

<47> 발모유도점수는 시각적 기준에 의해 발모의 상태에 따라 0점에서 3점까지 평가하였다 (도 1). 또한, 각 실험동물의 상태에 관한 자료의 통계학적 분석을 위하여 원-웨이 ANOVA를 실시하여 군간 유의성을 검정하였고, 유의성이 인정되면 Dunnett's t-test를 실행하여 대조군과 실험군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다 (p<0.05).

<48> 표 1과 같이 각 그룹별로 실험동물에 투여한 뒤 기록한 발모유도점수에 따라, 발모효능은 실험개시 24일 이후에 대부분 최대를 나타내었으며, 모낭세포 혼합군인 T3군에서 발모개시효과가 가장 빠르게 나타났다. 또한, 미녹시딜과 혼합투여군(MT)에서도 이와 유사한 효과를 보였으나, 24일 이후의 효능에서는 T3가 월등히 높은 것으로 나타났다. 모낭 세포 투여 후 14일째, 21일째 및 28일째에서 발모효과를 사진으로 기록하였다 (도2, 도3 및 도4). 또한 세포 투여한 날을 0일로 하였을 때 30일까지 각 개체당 발모유도점수를 기재, 군별 평균값을 산출한 도표는 다음과 같다 (표 3).

표 3

DAY	00	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.4	0.6	0.6	0.4	0
CS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2	0.6	0.6	0.2	0.2
NL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.4	0.8	0.8	0.4	0.4
NM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.8	1.2	1.2	0.8	0.8
PL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.6	0.6	0.8	0.6
PM	0	0	0.2	0.4	0.6	1	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.2	1.2	1.2	1.2	0.8	1.6	2	1.6	0.8	0
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.4	0.4	0.6	0.4	0.4
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.6	1	1.4	1	1	1
T3	0	0.6	0.8	1	1	1	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.6	0.6	0.6	0.6	2.2	2.8	2.4	2.2	1	0.2
T4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	1.4	2	1.2	0	0

T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.4	1.8	0.6	0.2	0.2
MC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2	0	0
MN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.6	0.6	0.6	0.2	0.2
MP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.6	0.4
MT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.6	0.8	0.2	0.2	0

발명의 효과

<50> 이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 두피조직을 체외에서 조직배양하여 얻어진 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포를 일정 혼합비율로 함유하는 발모유도용 세포 조성물, 탈모치료제 및 무모증치료제에 관한 것으로서 본 발명에 따라 얻어진 발모유도용 세포 조성물은 발모촉진을 위한 새로운 세포치료제로써 매우 유용하다.

<51> 삭제

<52> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 발모유도점수의 기준 발모상태를 나타내는 사진이다.
- <2> 도 2는 모낭세포를 각 실험군에 주사한 후 14일째의 각 군별 발모효과를 보여주는 사진이다.
- <3> 도 3은 모낭세포를 각 실험군에 주사한 후 21일째의 각 군별 발모효과를 보여주는 사진이다.
- <4> 도 4는 모낭세포를 각 실험군에 주사한 후 28일째의 각 군별 발모효과를 보여주는 사진이다.

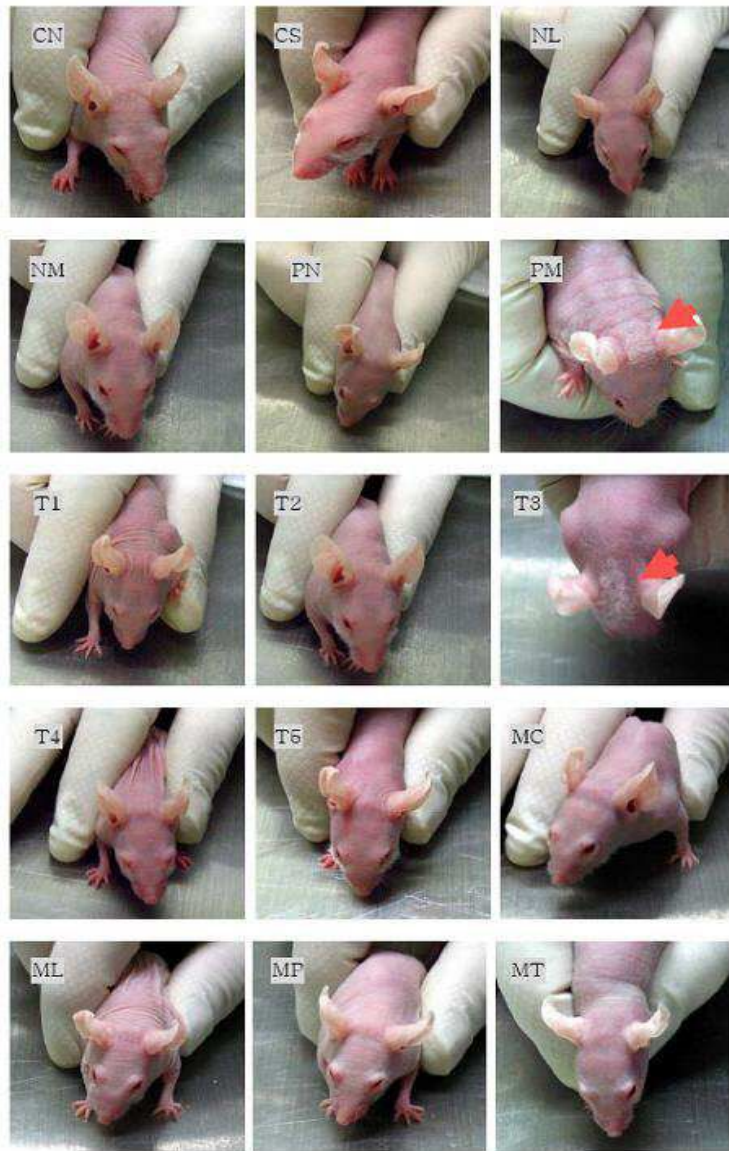
도면

도면1

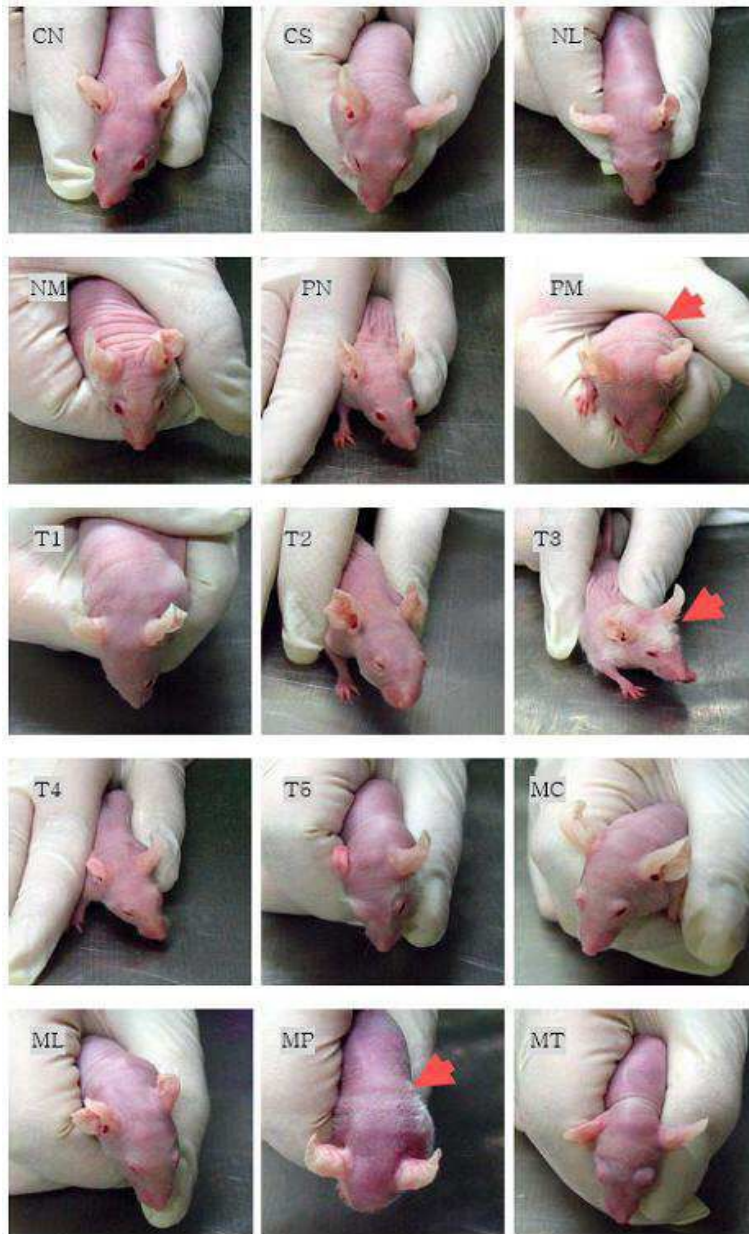
발모 형성유도 점수



도면2



도면3



도면4

