

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0020438

(43) 공개일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/073 (2010.01) *A61K 35/36* (2015.01)*A61K 8/98* (2006.01) *A61P 17/14* (2006.01)*A61Q 7/00* (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0605 (2013.01)*A61K 35/36* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0096160

(22) 출원일자 2018년08월17일

심사청구일자 2018년08월17일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김병수

서울특별시 강남구 압구정로 151, 201동 603호 (압구정동, 현대아파트)

이승진

서울특별시 은평구 연서로11길 32-9 (구산동, 공작타운)

김지혜

서울특별시 성동구 천호대로 400, 707호 (용답동, 신창비바패밀리)

(74) 대리인

특허법인 무한

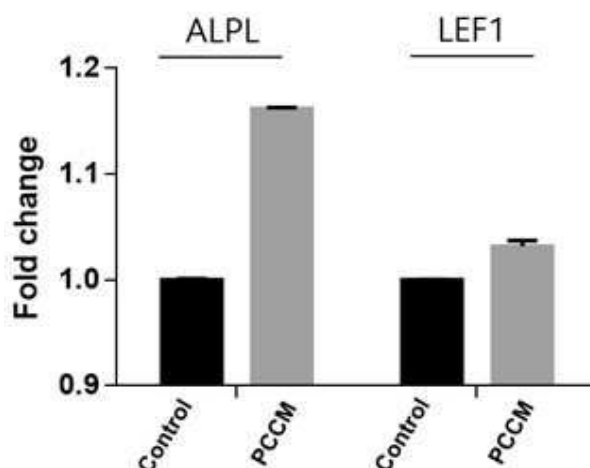
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 태반유래 세포 조건화 배지에서의 모낭세포 기능강화 및 대량생산 방법

(57) 요약

본 발명은 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지와 이를 이용한 모낭세포 생산방법 및 상기 태반유래 세포 조건화 배지 또는 모낭세포를 유효성분으로 포함하는 탈모 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 8/985 (2013.01)

A61P 17/14 (2018.01)

A61Q 7/00 (2019.01)

C12N 5/0627 (2013.01)

C12N 2501/20 (2013.01)

C12N 2506/025 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9C6027001

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발사업

연구과제명 직접교차분화 인간 신경줄기세포 배양생산 기술 최적화 및 안정성 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인간 태반유래 세포는 인간 음모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인, 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

Angiogenin, BDNF, IGFBP-2/4, IL-6, MCP-1, GRO, GRO-a, IGFBP-6, IL-8, Osteoprotegerin, TIM-1/2 및 uPAR로부터 선택되는 1종 이상의 인간 모낭세포 배양 유효 성분을 포함하는, 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하는 단계; 및

상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 모낭세포를 배양하는 단계; 를 포함하는, 모낭세포 생산 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 인간 태반유래 세포는 인간 음모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포인, 모낭세포 생산 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 태반유래 세포 조건화 배지는 Angiogenin, BDNF, IGFBP-2/4, IL-6, MCP-1, GRO, GRO-a, IGFBP-6, IL-8, Osteoprotegerin, TIM-1/2, uPAR로부터 선택되는 1종 이상의 인간 모낭세포 배양 유효 성분을 포함하는 것인, 모낭세포 생산 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 배양액은 DMEM/F-12인, 모낭세포 생산 방법.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된, 모낭세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물과 이를 이용한 모낭세포의 기능강화 및 대량생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 임상적용이 가능한 세포치료제 생산을 위해서는 공급원이 되는 줄기세포 혹은 전구세포의 고순도, 고효율 체외 배양이 필수적인데, 이때 체외 배양환경이 인체 환경과 유사한 상태에서 대량생산이 이루어져야 임상에서의 효율성 안정성을 보장할 가능성이 높아진다.

[0004] 최근까지 인간 모낭세포 배양에 대하여 많은 연구들이 진행되어 왔으나, 대부분의 기술들이 동물유래 지지세포를 사용하거나 동물유래 산물을 포함하여 인간 생체환경과 상이한 배양환경을 제공한다. 이러한 동물유래 산물을 포함하는 배지를 이용하는 경우 인간 생체환경과 상이한 배양환경을 제공하기 때문에 임상적용을 위한 세포의 대량생산 시스템에 적합하지 않을 뿐만 아니라, 이중 단백질 오염이 발생하는 등 임상적용 측면에서의 윤리성과 안전성을 담보하기가 곤란한 문제점이 있다.

[0005] 이에, 인간 생체 환경과 유사한 배양조건에서 표준화된 모낭세포를 배양 생산할 수 있는 기술의 개발에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.

[0006] 한편, 태반유래 세포 조건화배지를 이용하는 경우, 무동물 무지지세포를 이용하여 전능성 줄기세포를 배양할 수 있고, 케모카인 수용체인 CXCR2의 기전에 의해 증식 및 분화가 가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 인간 태반 모사 환경을 제공함으로써 모낭세포 배양 및 생산에 적용 가능한 태반유래 세포 조건화 배지를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 태반유래 세포 조건화 배지를 이용하지 않은 경우에 비해 모낭세포를 고순도, 고효율로 배양할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 목적은 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물 및 이를 이용한 모낭세포의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 또는 상기 배지 조성물에서 생산된 모낭세포를 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물이 제공된다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[0015] 일 측에 따르면, Angiogenin, BDNF, IGFBP-2/4, IL-6, MCP-1, GRO, GRO-a, IGFBP-6, IL-8, Osteoprotegerin, TIM-1/2 및 uPAR로부터 선택되는 1종 이상의 인간 모낭세포 배양 유효 성분을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0017] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 개선용 화장품 조성물이 제공된다.

[0018] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하는 단계; 및 상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 모낭세포를 배양하는 단계; 를 포함하는, 모낭세포 생산 방법이 제공된다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막관에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 태반유래 세포 조건화 배지는 Angiogenin, BDNF, IGFBP-2/4, IL-6, MCP-1, GRO, GRO-a, IGFBP-6, IL-8, Osteoprotegerin, TIM-1/2 및 uPAR로부터 선택되는 1종 이상의 인간 모낭세포 배양 유효 성분을 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 배양액은 DMEM/F-12일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 모낭세포가 제공된다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 이용하는 경우, 일반 배지에 비해 모낭세포를 고순도, 고효율로 대량생산 할 수 있다. 특히, 본 발명의 배지 조성물은 모낭세포의 형태 형성과 유지, 및 재생 능력 등 모낭세포 자체의 기능을 강화하여 질 높은 모낭세포의 생산을 가능하게 한다.

[0025] 또한, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물은 기존의 모낭세포 배양에 사용되는 성장인자 대신에 인간 유래 세포성분을 원료로 사용하고, 더블 코팅(double coating)이나 추가의 보충물(supplement)이 필요 없기 때문에 세포치료제 개발비용을 절감할 수 있으며, 모낭세포의 대량생산이 가능하다.

[0026] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 일반 배지와 태반유래 세포 조건화 배지 조성물이 함유하고 있는 사이토카인을 비교하여 나타낸 것이다.

도 2는 기존 모낭세포 성장배지와 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포를 형태학적으로 비교한 것이다.

도 3은 기존 모낭세포 성장배지와 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포가 모낭세포의 특성을 유지하는지 여부를 알칼라인 포스파테이즈(Alkaline phosphatase) 염색으로 확인한 것이다.

도 4는 기존 모낭세포 성장배지와 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포의 알칼라인 포스파테이즈(ALP) 염색에 양성인 세포 비율을 비교한 그래프이다.

도 5는 모낭세포 특이적 표지인 CD29 및 CD90(Thy-1)의 발현 여부를 유세포 분석(flow cytometry)으로 확인한 것이다.

도 6은 모낭세포 특이적 전사 인자인 ALPL과 LEF1의 발현 여부를 실시간 연쇄 증합효소 반응(Quantitative real-time PCR Analysis)으로 측정하여 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물과 일반 배지의 발모 효과를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0030] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0032] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "태반"은 산모의 모체로부터 출산 후 분리되는 태반을 의미한다. 태반은 분리된 후 신속하게 멸균된 용기 및 얼음에 담아 보관될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 탈모를 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 본 발명의 조성물에 의해 탈모에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0035] 본 명세서에서 사용된 용어 "조건화 배지(conditioned media)"는 세포에 의해 생산된 유효 성분 또는 세포의 유지 및 생존에 도움이 되는 인자들을 함유함으로써 기능이 변경된 배지를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포의 사이토카인을 함유하는, 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물이 제공된다.
- [0037] 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지는 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인 등의 인간 모낭세포 배양 유효성분을 추출하는 단계를 통해 제조될 수 있다.
- [0038] 또한, 태반유래 세포 조건화 배지 조성물의 제조에 사용되는 배양액은 우태혈청 등이 배제된 통상의 배양액일 수 있으며, 혈청대체제(Serum Replacement), 황산화제 및 항생제를 포함하는 DMEM/F-12인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 구체적으로는 20% Knockout Serum Replacer (GIBCO), 0.1 mM β mercaptoethanol, 및 1% penicillin-streptomycin (Sigma)가 보충된 DMEM/F-12을 이용할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에 포함되는 상기 인간 태반유래 세포는 인간 융모막관(chorionic

plate)에서 분리되어 배양된 태반유래 섬유세포-유사세포일 수 있다.

[0040] 보다 구체적으로, 상기 태반유래 섬유세포-유사세포는 다음의 과정으로부터 얻을 수 있다:

[0041] 1) 분리된 융모막판(chorionic plates)를 다지고, 37℃에서 30분간 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양한 후에 이 세포들을 20% fetal bovine serum (FBS; HyClone Laboratories Inc, Logan, UT, 100 U/ml penicillin, 및 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에서 37℃ 5% CO₂, 및 95% 습도 조건에서 배양한다.

[0042] 2) 상기 배지를 세 계대(passage)까지 매 3-4일마다 교환하면서 배양 동안 배지에서 떠오르는 세포 찌꺼기를 제거하고, 그 판에 부착된 태반-유래 섬유세포-유사 세포를 얻는다.

[0043] 상기 태반유래 세포 조건화 배지는 인간 모낭세포 배양 유효 성분을 포함할 수 있다. 구체적으로, 인간 모낭세포 배양 유효성분은 Angiogenin, BDNF, IGFBP-2/4, IL-6, MCP-1, GRO, GRO-α, IGFBP-6, IL-8, Osteoprotegerin, TIM-1/2 및 uPAR로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 본 발명의 조건화 배지는 이러한 모낭세포 배양 유효 성분을 포함하기 때문에, 보다 효율적으로 모낭세포의 생산을 촉진할 수 있다. 또한, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물은 배양 효율을 높이기 위해 녹아웃 혈청 대체제(Knockout Serum Replacement)를 더 포함할 수 있다.

[0044] 상술한 바와 같이, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지는 오직 인간 유래 산물로 구성되므로 모낭세포를 고순도, 고효율로 생산할 수 있으며, 이중 단백 또는 세포에 의한 오염을 방지할 수 있으므로, 상기 세포 조건화 배지에서 배양된 모낭세포를 이용하는 경우 임상에서의 안정성 및 효용성을 향상시킬 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 태반유래 세포 조건화 배지 또는 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 모낭세포를 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0046] 한편, 상기 약학적 조성물은 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제, 방부제 등과 혼합하여 사용될 수 있다.

[0047] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 텍스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 한편, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 방법은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 경구 투여하거나, 바람직하게는 탈모 부위에 바르거나 탈모의 진행이 예견되는 부위에 바르는 형태로 투여할 수 있다. 또한, 투여 방법에 특별한 제한이 있는 것은 아니므로 탈모 또는 탈모의 진행이 예견되는 부위에 주사의 형태로 직접 주입하거나, 동맥 또는 정맥 등에 주사하여 주입하는 것도 가능하다.

[0052] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 "경피투여형 제제"로 제형화하여 탈모의 예방 또는 치료용도로 사용할 수 있다. "경피투여형 제제"는 피부를 통해 약물을 투여하여 효과를 나타내는 제형으로, 피부에 바르는 약, 피부에 붙이는 약 등의 형태로 제형화된다. 경피투여 시 활성성분의 피부 투과는 농도 기울기에 따른 단순확산에 의해 세포 내, 세포간 또는 땀구멍, 털구멍 등의 부속기관을 통과하여 이루어진다. 이는, 손상되지 않은 피부를 통과하는 것이 용이하지는 않다는 단점이 있으나, 약물의 효율, 투여속도의 제어, 환부에 직접 적용 가능성 등의 사용상 용이점이 있으며 비교적 일정한 혈중농도 유지, 위장관 독성을 나타내는 물질의 부작용 최소화, 간의 부담 감소 등의 장점이 있다. 활성성분의 피부 투과를 용이하게 하기 위해서는 피부투여 촉진제를 추가적으로 포함하여 제형화할 수 있다.

- [0053] 또한, 상기 경피투여형 제제는 피부의 질환부 표면에 유효 성분을 직접 투여할 수 있는 제형이라면 제한없이 사용될 수 있다. 예를 들어, 연고제, 크림제, 젤제, 로션제, 액제, 유제, 현탁제, 경고제(스틱제), 파스타제, 리니멘트제, 파프제, 테이프제, 에어로졸제 또는 외용산제 등의 제제로 조제하여 사용할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 태반유래 세포 조건화 또는 태반유래 세포 조건화 배지에서 배양된 모낭세포를 배지를 유효성분으로 포함하는, 탈모 예방 또는 개선용 화장품 조성물이 제공된다.
- [0055] 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 허용되는 성분들을 제한 없이 포함할 수 있으며, 에센스 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 화장품 조성물은 샴푸, 린스, 트리트먼트 또는 두피관리제 등에 포함되어 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 인간 태반유래 세포를 배양액이 첨가된 세포 성장 배지에 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지를 제조하는 단계; 및 상기 태반유래 세포 조건화 배지에서 모낭세포를 배양하는 단계; 를 포함하는, 모낭세포 생산 방법이 제공된다.
- [0058] 모낭세포 생산 방법에 사용되는 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지의 성분과 제조 방법은 전술한 바와 같다. 또한, 본 발명의 모낭세포 생산 방법은 인간의 모낭세포에 생산에 한정되지 않으며, 개, 소, 양, 돼지 등 다양한 동물의 모낭세포 생산에도 활용될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 모낭세포 생산용 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포가 제공된다. 상기 모낭세포는 모낭세포의 형태학적 특성을 잘 유지하며, 기존의 모낭세포 생산배지에서 배양된 모낭세포에 비해 특이적 인자 발현 정도, 모발 유도 능력이 우수하다.
- [0060] 따라서, 본 발명의 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포는 그 자체로 탈모의 예방 또는 치료를 위한 세포치료제로 사용되거나, 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물, 화장품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] <실시예 1: 태반유래 세포 조건화 배지 조성물의 제조>
- [0064] 태반세포를 임신한 지 7주에 치료적인 유산을 받은 건강한 임산부로부터 서면 동의를 받은 후, 제왕절개로의 외과적 수술에 의해 분리된 태반 조직으로부터 얻었다. 태반의 용모막 용모조직으로부터 세포를 분리하고, 분리된 태반세포를 20% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100 U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 포함하고 0.1% 젤라틴이 코팅된 플라스크에서 일주일 동안 배양하여 태반유래 세포를 얻었다. GIBCO에서 구입한 DMEM/F-12, 20% Knockout Serum replacement, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 및 1% penicillin streptomycin의 조성으로 구성된 배지에 태반세포를 24시간동안 노출시켜 사이토카인을 함유하는 태반유래 세포 조건화 배지 조성물을 제조하였다.
- [0066] <실시예 2: 모낭세포 배양 유효성분의 탐색>
- [0067] 태반유래 세포 조건화 배지 조성물의 제조에 기본으로 사용한 배지(DMEM/F12)를 대조군으로 하고, 모낭세포 배양 유효성분을 탐색하기 위해 Ray Biotech의 Human cytokine antibody array kit를 이용하여 태반유래 세포 조건화 배지 조성물이 함유하고 있는 사이토카인을 비교 분석하여 도 1에 나타냈다.
- [0068] 도 1에 나타난 바와 같이, dot signal을 이용하여 모낭세포 배양에 필수적인 유효성분을 정하였다: Angiogenin, BDNF, IGFBP-2/4, IL-6, MCP-1, GRO, GRO-a, IGFBP-6, IL-8, Osteoprotegerin, TIM-1/2, uPAR.
- [0070] <실시예 3: 모낭세포의 형태학적 특성 비교>
- [0071] 상기 실시예 1에서 제조한 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포의 형태학적 특성을 분석하기

위해 기존 모낭세포 성장배지(Cat# CB-HDP-GM, 세포바이오)에서 배양된 모낭세포를 대조군으로 하여 비교하였다.

[0072] 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조한 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포가 기존의 모낭세포 성장배지에서 배양된 것보다 모낭세포의 형태학적 특성이 잘 유지되면서 성장하는 것을 확인할 수 있다.

[0074] <실시예 4: 모낭세포 특성 유지 확인>

[0075] 4-1. 알칼라인 포스파테이즈 염색

[0076] 본 발명의 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포가 그 특성을 유지하면서 성장하는지 확인하기 위해, 알칼라인 포스파테이즈 염색(Alkaline Phosphatase staining)을 통해 기존의 모낭세포 성장배지에서 배양된 대조군 모낭세포와 비교하였다. 알칼라인 포스파테이즈 염색은 ES Cell Characterization kit (Chemicon International)를 이용하여 수행하였다. 총 100개의 대조군 모낭세포에서 ALP의 활성을 갖는 세포는 8개였으며, 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포 100개 중 34개의 세포에서 ALP의 활성을 보였다. 이를 효율(%)로 계산하여 그래프를 만들었으며 3번의 반복 실험에 의해서 오차 범위를 구하였다. (**P<0.001)

[0077] 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포의 경우 기존의 성장배지에서 배양된 대조군에 비해 알칼라인 포스파테이즈의 발현량이 3배 이상인 것으로 확인되었다. 이를 통해, 본 발명의 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포는 기존 성장배지에서 배양된 모낭세포에 비해 형태 형성 및 재생 기능이 강화된 것을 확인할 수 있다.

[0079] 4-2. 모낭세포 특이적 인자 발현 확인

[0080] 모낭세포 특이적인 인자 CD29와 CD90(Thy-1)의 발현은 유세포분석(flow cytometry)으로 측정하였다. 유세포분석을 하기 위해 48시간 동안 태반유래 조건화 배지 조성물에서 모낭세포를 배양하여 수거하고 FACS tube에 1×10^5 cells를 분주하여 CD29, CD90 (BioLegend) 1차 항체를 30분 동안 4°C 어둠에서 방치한 후 유세포분석기(BD FACSCanto II)를 통해 측정하였다.

[0081] 모낭세포 특이적 전사 인자인 ALPL과 LEF1의 발현 여부는 실시간 연쇄 증합효소반응(Quantitative real-time PCR Analysis)을 이용하여 측정하였다. 실시간 연쇄 증합효소반응에 사용된 프라이머는 아래 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

유전자	정방향	역방향
ALPL	ATTGACCACGGGCACCAT	CTCCACCGCCTCATGCA
LEF1	CCCGATGACGGAAGCAT	TCGAGTAGGAGGGTCCCTTGT

[0083] 구체적으로, 키트(Qiagen RNeasy kit, Qiagen Hilden, Germany)를 이용하여 모낭세포로부터 RNA를 분리하고, 2 ug의 RNA, 올리고(dT) 및 역전사효소 (Superscript II reverse transcriptase, Gibco)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 각각의 cDNA에 ALPL 및 LEF1 검출용 프라이머와 마스터믹스(iQ SYBR Green qPCR Master Mix)를 넣고 기기(Bio-Rad iCycler iQ system, Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석 값은 GAPDH 유전자를 이용하여 정상화(normalized)하였다.

[0084] 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물에서 배양된 모낭세포는 모낭세포의 특성인 CD29와 CD90을 발현하며, 도 6에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 모낭세포 특이적 전사인자인 ALPL 및 LEF1을 더 많이 발현하는 것을 확인할 수 있다.

[0086] <실시예 5: 태반유래 세포 조건화 배지 조성물의 발모효과 검증>

[0087] 상기 실시예 1에서 제조된 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물과 DMEM/F-12, 20% Knockout Serum replacement, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 및 1% penicillin streptomycin의 조성으로 구성된 Basal 배지를 준비하여 제모 한 쥐에 하루에 한번씩 5일 동안 바른 다음 발모효과를 비교하였다.

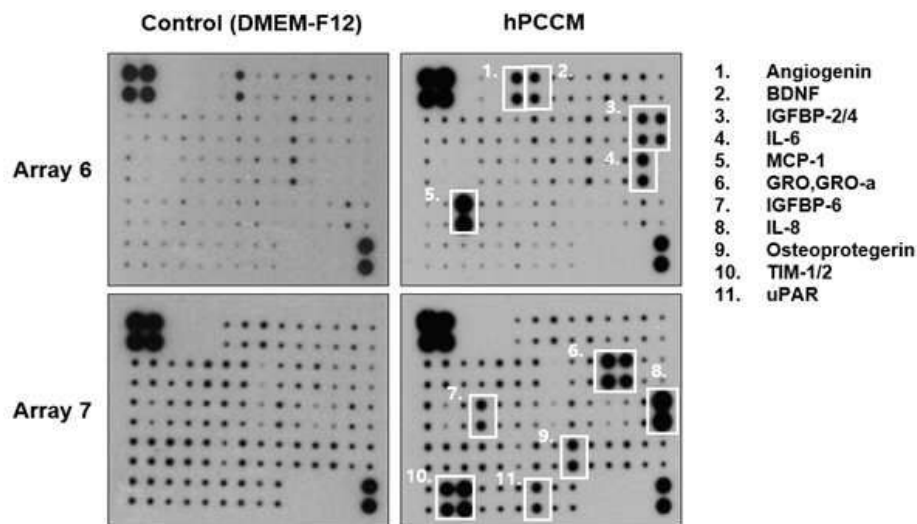
[0088] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 본 발명의 태반유래 세포 조건화 배지 조성물들을 발라준 쥐에서 털이 자라난 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 본 발명의 조건화 배지 조성물은 모낭세포의 생산에 효과적임을 알 수 있다.

[0090] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

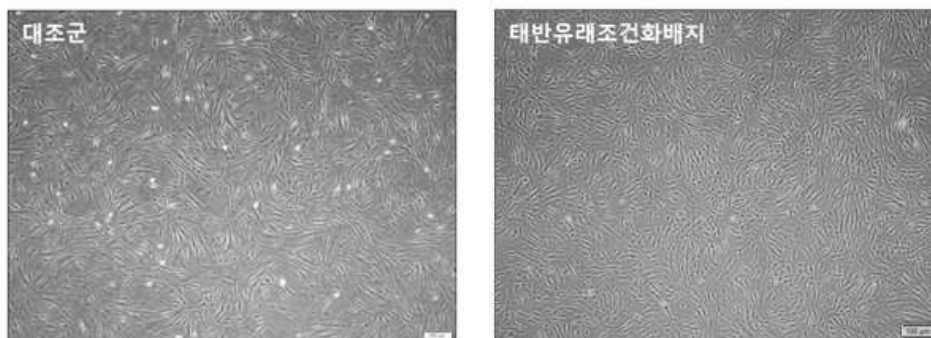
[0091] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1

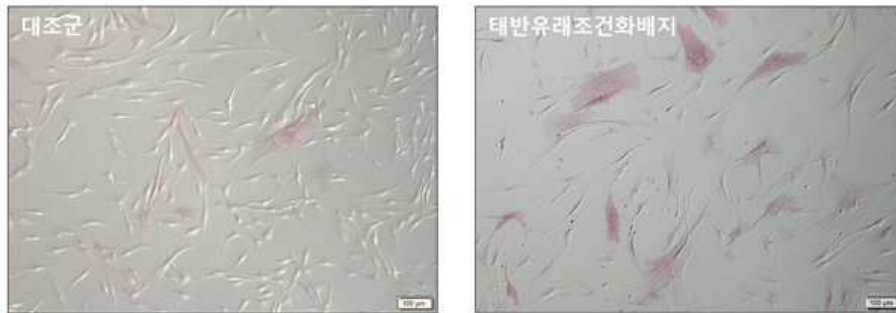


도면2

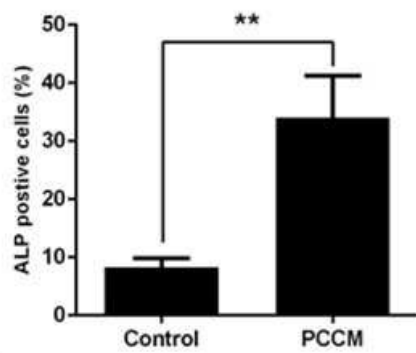


도면3

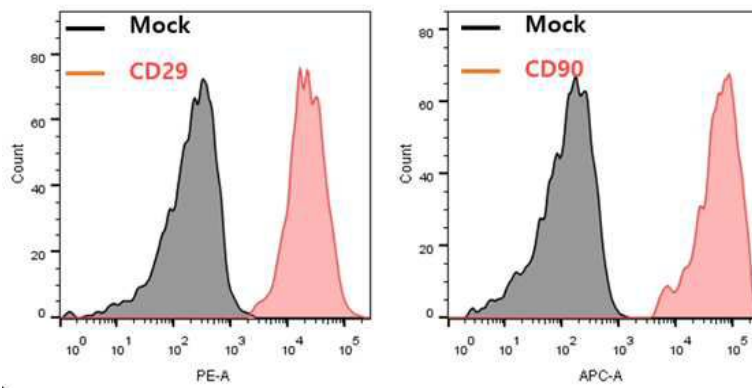
Alkaline Phosphatase staining



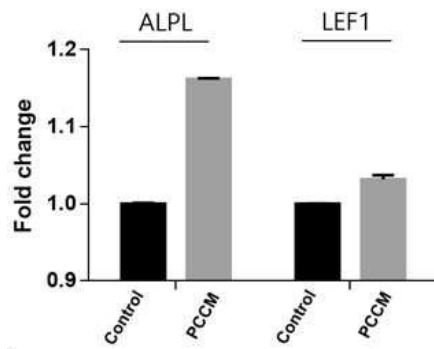
도면4



도면5



도면6



도면7



Control : 하루에 한번씩 Basal media를 5일 동안 바른 쥐



PCCM : 하루에 한번씩 태반유래조건화배지를 5일 동안 바른 쥐