

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2011년 11월 24일 (24.11.2011)



(10) 국제공개번호  
**WO 2011/145872 A2**

- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/003652
- (22) 국제출원일: 2011년 5월 17일 (17.05.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2010-0046940 2010년 5월 19일 (19.05.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):  
(주)바이오피드 (BIOPID CORPORATION) [KR/KR];  
강원도 춘천시 신북읍 산천리 343-1, 200-822 Gangwon-do (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 최성현 (CHOI, Seong Hyun) [KR/KR]; 강원도 춘천시 신북읍 산천리 343-1, 200-822 Gangwon-do (KR).
- (74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun Seo); 서울 송파구 방이동 22 대우유토피아빌딩 1910 호, 수특허법률사무소, 138-050 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING HAIR-LOSS OR STIMULATING HAIR GROWTH

(54) 발명의 명칭 : 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물

[Fig. 8]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing hair-loss or stimulating hair growth and containing phospholipids as an active ingredient. More particularly, the present invention relates to a composition for preventing hair-loss or stimulating hair growth and containing, as an active ingredient, phospholipids extracted from animals.

(57) 요약서: 본 발명은 인지질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 동물로부터 추출된 인지질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 인지질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 동물로부터 추출된 인지질을 유효성분으로 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 탈모의 원인으로는 남성호르몬 작용 과잉설, 피지 분비 과잉설, 혈액순환 불량설, 과산화물, 세균 등에 의한 두피 기능 저하설, 유전적 요인, 노화, 스트레스 등이 논의되어 왔으나 현재까지 탈모의 명확한 원인은 밝혀지지 않은 상태이다. 최근들어 식생활의 변화로 인한 영양 불균형, 환경오염 및 사회환경에 의한 스트레스의 증가 등으로 인해 탈모로 고민하는 인구가 늘어나고 있는 추세이며 그 연령 또한 낮아지고 있으며 여성의 탈모인구도 늘어나고 있는 실정이다.
- [3] 종래에는 이러한 탈모증의 치료나 예방에 있어서 혈행 촉진, 모근 기능 강화, 두피보습 및 남성호르몬 억제를 위한 여성호르몬을 주성분으로 한 제제나 미녹시딜(minoxidil), 피나스트라이드 (Finasteride), 트리코사카라이드(trichosaccharide)를 함유한 제제 등이 개발되어 있었다. 미녹시딜의 탈모효과에 대한 작용기전은 명확히 밝혀지지 않았으나, 혈관확장을 통한 영양공급의 증가 및 포타슘 채널 오픈링 (potassium channel opening) 효과로 인해 모발성장을 유도하는 것으로 여겨지고 있으며 피나스트라이드는 5- $\alpha$  환원효소 저해제로서, 투여용량을 달리하여 전립선 치료제 및 탈모 방지제로 사용되고 있다. 피나스트라이드는 편리성과 효능 면에서 우수한 약품이지만 이를 제조하는데 사용되는 시약이 고가이거나 맹독성이어서 제조원가에 부담을 주거나 환경을 오염시키는 문제점이 있고, 특히 부생성물의 제거가 용이하지 않아 목적물의 순도가 떨어질 수 있으며, 수분에 의해 활성이 저해되기 쉬운 시약 또는 활성 유도체를 사용함으로써 대량생산이 어렵다는 문제점이 있다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [4] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

##### 과제 해결 수단

- [5] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유효성분으로 인지질을 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물을 제공한다.
- [6] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 인지질은 동물로부터 추출된 것이 바람직하고, 상기 동물은 가축 예를 들어 소 또는 돼지인 것이 바람직하나 이에

한정되지 아니한다.

[7] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 인지질은 폐 세척액 또는 폐 조직의 파쇄물로부터 추출된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[8] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 인지질은 '포화도가 높고 지방산의 탄화수소(꼬리)의 길이가 비교적 짧은 인지질'이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 탄화수소(hydrocarbon)의 길이가 14-16개인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며, 예를 들어 다이팔미토일포스파티딜콜린, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 세린, 포스파디드산, 및 포스파티딜 이노시톨로 구성된 군으로부터 선택된 것을 포함한다.

[9] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 조성물은 2가 양이온과 카르복실기 함유 유기산 또는 그의 염을 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[10] 이하 본 발명을 설명한다.

[11] 본 발명은 남성형 탈모 및 여성형 탈모 등 모든 탈모 증상에서 보여지는 생화학적 및 생리학적인 공통적인 현상에 대한 문헌적 고찰을 통하여 탈모에 대한 새로운 해결 방법을 제시하고자 한다. 탈모에 대한 새로운 고찰과 해결 방법은 다음과 같다:

[12] Yanez Soler는 그의 논문을 통하여 탈모의 원인은 피지선(sebaceous gland)에서 분비되는 피지(sebum)가 머리털을 타고 외부로 분비되어야 하는데, 그 반대방향인 모근(follicular 또는 dermal papilla) 방향으로 흘러 들어가게 되어 탈모가 일어난다고 가설을 제시하였다. 피지가 털(hair shaft)을 따라서 용이하게 밖으로 배출되는 조건을 가질 경우, 예를 들면, 털 또는 모발이 굵거나 밀도가 높을수록 탈모는 쉽게 일어나지 않는다고 가정하였다. 그의 가설을 설명하는 하나의 훌륭한 예는, 베개를 베는 부위는 탈모가 일어나지 않는다는 현상이다. 인간이 수면을 취하는 동안, 머리카락들이 베개로 인하여 눌리고 서로 접촉함으로써 피지가 털의 표면을 따라 쉽게 제거되기 때문이라는 것이다 (Yanez Soler 2004. Med. Hypotheses 62: 980-985).

[13]

[14] \*본 발명에서는 탈모의 근본적인 원인이 중성지방 성분으로 구성된 피지의 과도한 분비와 누적이 탈모증상과 깊게 연관되어 있다고 가정하고, 이를 바탕으로 모든 탈모의 원인에 대하여 설명이 가능하게 하고자 한다. 특히 많은 남성들이 나이가 들면서 탈모 증상으로 고통받는 이유를 쉽게 설명하려 한다. 생화학적 및 생리학적인 탈모의 원인들은 다음과 같은 문헌들로부터 공통성과 이론의 합리성을 갖는다:

[15] ◎남성 호르몬인 안드로젠(androgen)은 체내의 대표적 중성지방인 트리아실글리세롤(triacylglycerol, TG)과 cholesterol의 증가와 깊게 연관되어 있다 (Kao et al. 2001. J. Int. dermatol. 116: 443-451).

[16] ◎나이가 들면서 체내의 극성지방에 비하여 중성지방의 비율이 높아진다

- (Nazzaro-Porro et al. 1979. J. Invest. Dermatol. 73: 112-117).
- [17]    ◎피지의 분비와 피지선의 활동은 나이에 따른 남성호르몬의 수준(level)과 깊게 연관되어 있다 (Pochi et al. 1979. J. Invest. Dermatol. 73: 108-111).
- [18]    ◎스트레스로 인하여 대표적인 중성지방인 콜레스테롤의 합성이 증가한다 (O'Donnell et al. 1987 J. Royal Society Med. 80: 339-341).
- [19]    ◎일부 암환자들이 화학요법을 받은 후, 중성지방 (특히, 트리아실글리세롤)과 엘디엘 (LDL, low density lipoprotein) 및 엘디엘-콜레스테롤 (LDL-cholesterol)의 증가를 보인다 (Alexopoulos et al. 1992. Cancer. Chemother. Pharmacol. 30: 412-416).
- [20]    ◎피지나 표피주변을 구성하는 지질의 불포화지방산이 지질의 산패(lipid peroxidation)과정을 거치며 생산되는 싱글렛 산소 라디칼 (singlet oxygen,  $^1O_2$ )에 의해 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 받을 경우 탈모가 일어날 수 있다 (Naito et al. 2008. International J. Mol. Med. 22: 725-729).
- [21]    ◎일부 탈모증상의 환자들은 미세염증(microinflammation)을 보이는 경우가 있다. 과도한 피지 분비가 미생물의 부착과 증식에 좋은 환경을 줄 가능성이 있다 (Mah et al. 2000. International J. Dermatol. 39: 576-584).
- [22]    위에 열거된 과학적 근거들로부터 남성호르몬, 스트레스 및 노화가 체내 중성지방의 비율을 높이고, 중성지방 성분의 과도한 피지 합성과 분비가 탈모증상을 일으킬 수 있다고 쉽게 추론할 수 있다. 유전적인 요인으로 인하여 탈모가 일어나는 경우, 중성지방 합성의 대사가 높은 쪽으로 유전적인 조건을 갖게 한다면, 극성지방과 중성지방의 비율의 불균형이 유발되어 탈모가 촉진될 수 있다고 추론할 수 있다. 특히 미토콘드리아가 주로 지질대사에 관련된 역할을 많이 함으로써, 대머리의 유전은 미토콘드리아의 전달경로인 모계 유전이라고 예상할 수 있다. 미토콘드리아와 관련되어 지질 대사의 어떠한 변이나 불균형이 대머리를 갖게 한다고 볼 수 있다.
- [23]    여자들이 남성형 탈모를 보이지 않는 이유는 생리적으로 피지의 분비가 적을 뿐만 아니라 일반적으로 세안을 남성 보다 상대적으로 철저하게 하고, 세안 시 다양한 화장품을 사용함으로써 중성지방 성분의 피지 제거가 상대적으로 효과적이기 때문이라 생각한다. 또한 화장품에 함유된 다양한 지방산들, 지방산 유도체들 및 다양한 유화제 성분들이 중성지방의 피지가 높은 점도를 갖는 것을 방지하기 때문에 남성형 탈모 증상을 보이지 않는다고 추론할 수 있다.
- [24]    더불어, 일반적으로 체모가 적은 동양인과 체모가 많은 서양인의 차이도 같은 이유로 설명될 수 있다. 탄수화물 섭취 위주의 동양인은 체내 지방축적이 이루어지기 시작하면 저장 형태의 지방인 중성지방이 쉽게 높아지기 때문에 동양인의 체모 발달이 서양인에 비하여 덜 한 이유도 설명될 수 있다.
- [25]    중성지방인 피지가 머리카락을 따라 밖으로 배출되지 않고, 모근 방향으로 이동되어 누적되면 모세혈관으로부터 영양분을 공급받는 모근 세포와 주변세포들은 생장과 세포활동에 장애를 받게 된다. 세포 분화와 세포활동에

필요한 영양분들은 마이셀 형태(micelle) 또는 리포솜의 형태(HDL 또는 LDL, secretory vesicles 또는 lamellar bodys 등)로 공급되기 때문에, 중성지방의 피지가 모근 세포 주변에 누적되면 지질막(lipid layer)등에 둘러싸여 공급되는 영양분들이 전달되는 것을 방해 받게 된다. 또한 중성지방은 물(수분)을 밀어내므로 혈관으로부터 확산(diffusion)에 의해 전달되는 수용성의 작은 분자들(포도당 또는 아미노산 등등)이 모근세포로 전달되는 것도 차단하게 된다. 탈모가 일어날 때 공통적으로 나타나는 모근(hair follicle)의 소형화(miniaturization) 현상은 중성지방의 축적에 의해, 모근 및 관련 주변 세포들이 혈관으로부터 원활한 영양공급을 저해 받게 되면서 세포의 활동과 크기가 수축하여 탈락 되는 것으로 설명할 수 있을 것이다. 또한 모근세포의 주기에 따라 한번 탈락 되면 다시 새롭게 털이 성장해야 하는데, 중성지방의 누적은 모근 형성을 하는 줄기세포들이 dermal papilla로 이동하는 것도 저해하여 새로운 모발이 형성되는 것도 방해를 하게 된다고 추론할 수 있다.

- [26] 근래에는 남성들도 탈모로 고통받고 있는 20-30대 젊은 남성들이 늘어나고 있다. 젊은 남성들이 보이는 탈모증상도 중성지방 대사와 연관하여 그 원인을 설명하면 다음과 같다. 1980년대에 들어와서 식물성 오일류(대두유, 옥수수유, 포도씨유, 면실유, 올리브유 등등)가 저렴한 가격으로 대량 유통되면서 다양한 식생활에서 튀김류 또는 유장된 음식들의 섭취가 늘어나게 되었다. 이들 상업화된 식물성 오일들은 주로 중성용매(예를 들어, n-hexane)들을 이용한 용매추출법으로 대량으로 제조된다. 중성용매를 이용한 추출법은 식물에 함유된 극성지질들이 제품에 함유될 조건과 기회를 주지 않기 때문에, 거의 순수한 중성지방으로 조성된 맑고 투명한 식물성 오일이 시판되게 한다. 그 결과로 불포화 지방산을 함유하는 식물성 중성지방을 많이 섭취하게 되어, 현대인은 중성지방의 대사 의존도가 높아졌고, 중성지방의 체내 축적 및 중성지방 성분의 피지 분비도 높아지게 되었다고 추론할 수 있다. 위에서 기술하였듯이 과도한 중성지방은 탈모의 원인이 될 수 있다. 더불어 식물 유래의 중성지방은 불포화지방산을 다량 함유하기 때문에 공기 중에 노출되면 산소분자와 결합하여 '지질 산패 (lipid peroxidation)'라는 일련의 화학반응 과정을 거치게 된다. 산패 과정에 의한 산화적 스트레스 (oxidative stress)는 탈모를 가속시키는 원인이 될 수도 있다. 젊은 나이에 보이는 탈모 증상은 개개인의 정신적 스트레스에 의해 발생하는 원인들도 있겠지만, 중성지방과 연관된 일련의 생리화학적 작용들로도 설명이 가능하다. 또한 식물성 불포화 지방산의 일부가 아라키도닉산(Arachidonic acid)으로 변화되면서 염증 반응을 증폭시킬 가능성도 있다고 추정된다.

- [27] 과도한 중성지방 성분의 피지 분비와 피지의 모근 방향으로 역행이 탈모의 원인이 된다면, 기존에 알려져 있는 고전적인 방법들을 이용하여 증상을 완화시킬 수도 있다. 예를 들어 안드로젠(Androgen)의 활성 억제 방법을 이용하여 피지의 합성과 피지 분비를 감소시키거나, 콜레스테롤로부터

안드로젠이 합성되지 못하도록 저해제들(inhibitor)을 사용하여 안드로젠의 활성을 줄이는 방법을 택할 수 있다. 예를 들어, 발모제로 말초혈관 확장제인 미녹시딜(minoxidil) 과 5알파-리덕테이즈(5 $\alpha$ -reductase)의 억제제인 피나스테라이드(finasteride)를 사용하는 방법들이다. 하지만 두 약물은 장기간 사용해야 효과를 볼 수 있는 것으로 알려져 있으며 일부 사용자에게서는 탈모방지 효과를 보이지 않는 것으로도 알려져 있다. 피나스테라이드의 장기간 복용은 성기능 장애, 정액감소 및 성욕 감소 등의 부작용이 보고된 바 있으며(Kaufman et al. 1998. J. Am. Acad. Dermatol. 39: 578-589), 미녹시딜은 접촉성 피부염 및 습진 등의 증상을 동반하거나 일부 환자들에서 두통을 유발하는 것으로 보고되어 있다 (Oslen et al. 2002. J. Am. Acad. Dermatol. 47: 377-385).

- [28] 또 다른 탈모방지 방법들로는 강력한 세정효과를 지닌 세제나 샴푸 등을 이용하여 피지를 지속적으로 제거하는 방식이 있다. 지속적인 피지의 제거는 피지가 모근방향을 역행하는 현상을 방지해 줄 가능성이 있다. 하지만, 강력한 세제나 샴푸의 사용은 두피나 표피에 화학적 자극을 주거나 피지의 본연의 기능인 두피 및 표피의 보호기능을 약화시켜 발생하는 역효과도 불러올 가능성도 있다.
- [29] 그러므로 피지의 생산과 분비를 줄이거나, 쌓여 있는 피지를 제거하는 방식들을 택하는 것보다, 단순히 피지의 성질을 변환시켜 피지가 용이하게 배출되게 하여 탈모를 예방하고, 혈관으로부터 모근 세포와 주변세포들이 영양분을 쉽게 받을 수 있도록 조건을 형성시켜 주어 모발의 성장을 촉진하는 방법을 선택하는 것이 안전한 방법일 것이다.
- [30] 본 발명은 동물의 폐로부터 추출한 후 정제된 인지질, 2가 양이온, 유기산 (유기산과 유기산염을 이용한 pH 완충 용액 및 2가 양이온에 의하여 인지질이 뭉치는 현상을 방지하기 위한 목적, 예를 들어 구연산 및 구연산염, pH5.8)을 함유하는 조성물을 쥐의 표피에 직접 적용(topical application) 했을 때, 이 조성물은 표피의 염증을 진정시키는 역할 이외에도 모근의 분화를 촉진하고 모발의 성장을 빠르게 한다는 것을 발견하였다.
- [31] 본 발명에서 관찰된 결과는 기존에 발표된 결과와 -상피(epidermis)의 기저세포층(basal cell layer)의 함몰(budding)로 시작되어 새로운 구형함몰(bulge)안에 follicle이 형성되는 모근 형성의 전형적인 과정 - 다른 형태로 모근 세포들이 활성화된 현상을 보여주었다. 조직 검사의 관찰 결과로는 진피층에 산재되어 있던 기존의 모근 세포가 빠르게 분화하여 성장한 것으로 판단되며, 기존의 발표된 논문에 개재된 결과보다 많은 수의 모근(hair follicle)이 생성된 것을 알 수 있었다(도 7-8 참조). 이런 발견으로부터 이 조성물이 육모의 기능을 나타내는 원인을 고찰하였고 이를 바탕으로 탈모의 원인에 대하여 새롭게 이론을 정립하였다.
- [32] 따라서 본 발명은 모발의 탈모를 방지하고 모발의 성장을 촉진하는

조성물이다. 본 발명은 탈모의 원인에 대하여 새로운 이론을 정립하고, 새로운 개념의 탈모방지 및 육모를 위한 조성물을 제시한다. 동물의 폐(허파) 조직에서 중성지방과 단백질들의 제거과정을 거쳐 정제된 인지질과 2가의 양이온(칼슘 이온 또는/그리고 마그네슘 이온) 그리고/또는 유기산 (예, 구연산과 구연산 염)을 함유는 조성물로써 모발의 성장을 촉진시킨다. 계란 또는 대두에서 추출한 인지질(일반적으로 '레시틴'이라 칭함)을 사용하는 것과 달리, 동물 및 사람의 폐 세포로부터 몸 밖으로 분비되는 독특한 형태의 인지질들을 이용하는 것을 특징으로 하며, 이들은 지질 산화작용에 대하여 안정성을 가지므로 두피 및 표피 등의 공기에 노출된 부위에 적용할 때 장점을 갖는다.

- [33] 본 명세서에서 사용되는 용어 "추출물"은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 상술한 용매 분획물도 포함한다.
- [34] 본 발명의 폐 추출물은 용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 폐 추출물에 포함되는 것이다.
- [35] 본 발명의 폐 추출물 또는 그 분획물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [36] 본 발명의 조성물은 탈모 방지 또는 육모 촉진에 매우 효과적으로 작용한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "탈모 방지" 또는 "육모 촉진"은 동일한 의미로 사용되며, 이는 당업계에서 이용되는 또 다른 용어 양모 또는 발모 촉진과 동일한 의미를 가진다.
- [37] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로 제공될 수 있다.
- [38] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [39] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여, 보다 바람직하게는 도포에 의한 국소 투여 (topical application) 방식으로 적용된다.
- [40] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함된 생리활성물질인 인지질의 투여량은 성인 기준으로 0.001-1000 mg/kg, 바람직하게는 0.001-100 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.01-50 mg/kg 범위 내이다.
- [41] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [42] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 폐추출물 및 그로부터 분리된 인지질뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다. 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 폐추출물 및 그로부터 분리된 인지질 이외에, 본 발명의 작용(육모 작용)을 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 양모제 또는 육모제를 함께 혼합하여 사용할 수 있다.
- [43] 상기 담체로서, 정제수, 일가 알코올류(에탄올 또는 프로필 알코올), 다가 알코올류(글리세롤, 1,3-부티렌글리콜 또는 프로필렌글리콜), 고급 지방산류(팔미틸산 또는 리놀렌산), 유지류(소맥 배아유, 동백기름, 호호바유, 올리브유, 스쿠알렌, 해바라기유, 마카데미아땅콩유, 아보가드유, 대두 수첨가 레시틴 또는 지방산 글리세라이드) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한 필요에 따라 계면활성제, 살균제, 산화방지제, 자외선 흡수제, 소염제 및 청량제를 첨가할 수 있다.
- [44] 계면활성제는 폴리옥시에틸렌, 경화 피마자유, 폴리옥시에틸렌, 올레일에테르, 모노올레인산폴리옥시에틸렌, 폴리옥시에틸렌, 글리세릴모노스테아레이트, 모노스테아린산소르비탄, 모노올레인산폴리옥시에틸렌, 소르비탄, 자당지방산에스테르, 모노라우린산헥사글리세린, 폴리옥시에틸렌 환원라놀린, POE, 글리세릴피로글루타민산, 이소스테아린산, 디에스테르, N-아세틸글루타민 및 이소스테아릴에스테르로 이루어진 군에서 선택적으로 포함할 수 있다.
- [45] 살균제는 히녹티올, 트리크로산, 크롤헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아즐렌 (azulene), 살리실산 및 징크피리타온으로

이루어진 군에서 선택적으로 포함할 수 있다.

- [46] 산화방지제는 부틸히드록시아니솔, 몰식자산, 몰식자산프로필 및 에리소르빈산 중에서 어떠한 것도 사용가능하다.
- [47] 자외선 흡수제는 디히드록시벤조페논 등의 벤조페논류, 멜라닌, 파라아미노벤조산에틸, 파라디메틸아미노벤조산 2-에틸헥실에스테르, 시녹사이트, 파라메톡시게피산 2-에틸헥실에스테르, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸, 우로카닌산 및 금속산화물 미립자 중에서 어떠한 것도 사용가능하다.
- [48] 소염제로는 글리틸리틴산디칼륨 또는 알란토인을 사용할 수 있고, 청량제로는 고추틴크 또는 1-멘톨을 사용할 수 있다.
- [49] 상기 조성물의 제형은 폐추출물 및 그로부터 분리된 인지질을 유효 성분으로서 배합할 수 있는 임의의 제형으로서 탈모방지 또는 육모용 화장품의 형태로는 헤어토닉, 헤어크림, 헤어로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어스프레이, 헤어에어졸, 포마드, 분말, 젤 등과 같이 용액, 솔젤, 에멀전, 오일, 왁스, 에어졸 등 다양한 형태로 제조될 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [50] 본 발명의 조성물은 모발성장 촉진 보조성분을 추가로 포함할 수 있다. 모발성장 촉진제 보조성분은 5알파-환원효소 억제 성분, 모근 및 모낭세포 활성화 성분, 모낭세포 혈류 증강 성분, 살균 성분, 비듬방지제, 각질 연화제, 청량제, 보습제 등을 포함한다. 각 작용에 대한 성분의 예는 다음과 같다.
- [51] 1) 5알파-환원효소 억제 성분
- [52] 녹차추출물, 피나스테라이드, 백자인추출물, 고삼추출물, 리놀레익에씨드, 감마리놀레닉에씨드, 호호바유, 올리브유, 해바라기유, 아보카도유, 대두유 첨가 레시틴, 정향추출물, 의이인추출물, 오배자추출물, 울금추출물, 빈랑자 추출물, 아선약추출물, 견우자추출물, 차전자추출물, 강진향추출물, 감초추출물, 보골지추출물, 소팔미토, 사과추출물 등
- [53] 2) 모근 및 모낭세포 활성화 성분
- [54] 당약추출물, 인삼추출물, 홍삼추출물, 다래추출물, 정향추출물, 의이인추출물, 생지황추출물, 하수오추출물, 황정추출물, 판토텐닐에칠에텔, 디판테놀, 헨나추출물, 창포추출물, 히노키티올, 니코틴산아미드, 엘멘톨 등
- [55] 3) 모낭세포 혈류 증강 성분
- [56] 미녹시딜, 은행추출물, 홍삼추출물, 고추틴크, 초산토코페롤, 니코틴산벤질 등
- [57] 4) 살균 및 각질 용해 성분
- [58] 살리실산, 헨나추출물, 창포추출물, 피록톤올아민 등
- [59] 5) 비듬방지제
- [60] 케토코나졸, 녹차추출물 등
- [61] 6) 청량제
- [62] 엘멘톨 등
- [63] 7) 보습제

- [64] 올리브유, 호호바유, 동백유, 해바라기유, 마카다미아유, 아보카도유 등의 오일류
- [65] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [66] 본 발명에서 제시하는 탈모에 대한 해결책은 다음과 같다:
- [67] 1. 극성지방을 이용하여 중성지방인 피지의 성질을 바꾸는 것이다.
- [68] 대표적인 극성지방인 인지질은 독특한 양쪽성 (amphiphilic) 물질로 중성지방과도 잘 섞일 수 있으며 동시에 물과도 잘 섞일 수 있다. 이런 성질의 인지질을 이용하여 피지의 성질을 바꿔주는 것이다. 피지를 물과 잘 섞이도록 하여 배출을 용이하게 하고, 피지가 모근 방향으로 역류하여 누적되거나, 누적된 피지가 혈관으로부터 전달되는 영양분들을 차단하지 못하도록 하는 것이다. 인지질은 세포막을 구성하는 지질로 모근세포 및 주변 관련 세포들에게 필요로 되는 세포막 구성물(membrane building block)로도 제공될 수 있다.
- [69] 비누나 샴푸의 사용은 피지 성분 중에 약간이나마 극성도(polarity)가 있는 지방산(fatty acids)이나 콜레스테롤 등을 상대적으로 쉽게 제거 할 수 있으나, 트리아실글리세롤 이나 콜레스테롤에스터 같은 완전한 중성 지질들은 제거하기 어렵다. 그러므로 비누나 샴푸의 빈번한 사용은 점차적으로 피지에 함유된 지방산과 콜레스테롤등의 비율을 떨어뜨려 피지의 고형화를 가져올 우려가 있다. 인지질을 이용한 피지의 성질을 바꾸는 방식은 피지의 고형화를 방지하여 피지의 배출을 용이하게 할 뿐만 아니라, 비누나 샴푸 사용 시 피지의 제거도 쉽게 해 줄 것으로 기대된다.
- [70] 2. 인지질은 선별되어 사용되어야 한다.
- [71] 식물성 인지질은 불포화지방산을 다량 함유함으로써, 두피 또는 표피에 적용 시 공기중에 노출되어 산소와 접촉하게 되면 쉽게 지질 산화(lipid peroxidation)과정을 겪게 된다. 지질 산화에 의해 발생하는 싱글렛 산소 라디칼(singlelet oxygen,  $^1O_2$ )은 표피 세포 및 모근 세포에 부정적인 영향(oxidative stress)을 주게 된다. 지질의 산패 기작에 의해 탈모(Naito et al. 2008. International J. Mol. Med. 22: 725-729) 또는 원형탈모증(alopecia areata)의 증상이 나타날 가능성에 대해서는 이미 보고된 바가 있다(Koca et al. 2005. Med. Sci. Monit 11: 296-299).
- [72] 인지질을 생체의 표피에 사용하려면 불포화지방산 함량이 낮거나 또는 불포화지방산을 함유하지 않는 인지질을 사용해야 한다. 생리적으로 산소와 가장 많은 접촉을 하는 폐는 포화인지질을 가장 많이 함유하는 유일한 장기이다. 폐의 이러한 특성은 호흡을 용이하게 하기 위하여 폐표의 표면장력을 낮추기 위한 방법인 동시에, 호흡을 하면서 계속적으로 산소에 노출이 불가피 하므로, 지질 산패의 부정적인 효과로부터 보호받기 위한 하나의 진화의 결과물로 여겨진다. 그 결과 인간을 포함한 모든 동물의 폐는 '포화지방산을 다량 함유하는 인지질'을 가장 많이 갖고 있고, 이런 인지질을 폐 표면으로 계속 분비하고 있다. 그러므로 표피 또는 두피에 적용할 수 있는 인지질로는 동물의 폐로부터 유래된

인지질을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

- [73] 일부 탈모 관련 제품들은 식물 추출 오일이나 특정 지방산을 사용하는 경우들이 있다. 식물 추출 오일들이나 식물 유래 지방산들은 피지의 액화(유동성의 증가)를 가능하게 할 수 있을 것이다. 또한 피지의 배출을 용이하게 하여 발모 또는 탈모 방지의 효과를 보일 수 있으나, 불포화지방산의 산화로 인하여 유발될 수 있는 역효과에 대해서는 충분히 고려하지 못한 점이 있다고 판단된다.

- [74] 3. 인지질의 효과를 극대화 하기 위한 보조인자(co-factor), 2가 양이온

- [75] 단순히 인지질을 두피에 공급하여 탈모가 방지되거나 머리카락이 빨리 자라기를 기대하긴 어렵다. 외부로부터 공급되는 인지질이 dermal papilla 와 관련 주변 세포들에 공급되기 위해서는 2가 양이온들, 특히 칼슘이온( $\text{Ca}^{2+}$  ion)이 필수적이다. 일반적으로 칼슘이온( $\text{Ca}^{2+}$  ion) 또는 마그네슘이온( $\text{Mg}^{2+}$  ion)은 세포-세포 접촉인식 (cell-cell recognition)에 사용되며 micelle 이나 liposome이 선택된 cell의 막(membrane)으로 융합(fusion 또는 integration)되는데 필수적인 요소이다. 선택된 인지질이 생체에 사용되어 효과를 나타내려면 2가 양이온은 필수적으로 함께 존재해야 한다. 또한 이들 2가 양이온들은 인지질의 인산(phosphate)기의 네거티브 극성을 중화시켜 인지질들이 방향(orientation)을 결정하거나 나열되어 안정화된 구조를 갖는데 도움을 줄 것으로 기대된다. 본 발명의 비한정적인 실시예에 사용되는 2가 양이온인 칼슘의 농도는 생체의 폐포가 갖고 있는 고유의 칼슘 이온농도를 모방하여 적용을 하였다.

- [76] 4. 인지질의 효율적인 작용을 위한 보조인자(co-factor), 유기산

- [77] 인지질은 강하게 극성을 띠고 있는 머리(lipid polar head) 부위 때문에, 2가 양이온에 의해 강하게 뭉치는(agggregation) 현상을 보인다. 2가 양이온에 의해 뭉쳐진 인지질은 표피에서 쉽게 퍼지(dispersion)지 않으며, 뭉쳐진 덩어리(agggregates)의 크기 때문에 표피로 쉽게 침투되지 못하게 되어, 인지질이 갖는 육모 및 탈모방지의 효과를 크게 기대하기 어렵게 된다. 2가 양이온이 인지질을 무작위로 뭉치게 하는 영향을 최소화 하기 위하여 네거티브 극성을 강하게 띠는 유기산(예, citrate/citric acid 또는 succinate/succinic acid 등과 같이 구연산 회로(TCA cycle)에 연관된 유기산들)과 함께 조성물에 사용하면 이를 해결 할 수 있다. 이들 유기산들은 2가 양이온에 의해 인지질이 뭉치는 상호작용을 간섭하는 역할을 하게 된다. 이는 대표적 킬레이트 화합물(chelating chemical)인 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)가 2가 금속이온을 고착하는 것과는 다른 방식이다. 또한, 유기산은 짝산과 짝염기의 형태로 존재함으로써 (예, 구연산 과 구연산 나트륨) 두피에 적용하는 액상제제의 산도(pH)를 조절하는 완충용액으로도 사용될 수 있는 장점이 있다.

- [78]

- [79] 본 발명의 차별성

- [80] 기존 특허 중에는 인지질을 이용하여 모발의 성장을 촉진하는 방법들이 제시된

예들이 있다.

- [81] US patent no.4,828,837 및 US patent no. 4,761,288은 미녹시딜의 효과를 극대화하기 위하여 인지질을 이용한 리포솜을 제조하였다. 이들은 콩(Soy), 난황(egg yolk) 또는 합성(synthetic)된 DPPC(dipalmitoyl phosphatidylcholine) 및 인지질(레시틴)을 사용하여 미녹시딜을 함유(encapsulating)하는 리포솜을 이용하였다. 또한 리포솜 구조의 안정화를 위하여 중성지방인 콜레스테롤을 추가로 첨가하여 실험 예들을 제시하였다. 본 발명은 미녹시딜 같은 모발 성장을 촉진하는 성분을 전달(delivery)하는 목적을 갖지 아니하며, 동물의 폐에서 추출 후 정제된 인지질 성분을 이용하여 모발의 성장을 빠르게 하는 목적을 갖는다. 보편적 지식으로 생체 내 구성 성분인 인지질이 표피의 기저층에 산재되어 있는 줄기세포를 자극하여 모근 세포로 분화시킬 수 있다고 판단하기는 어렵다. 그러므로 본 발명의 원리는 동물의 폐 조직으로부터 순수하게 정제된 인지질을 이용하여 중성지방 성분의 피지의 성질을 변화시켜, 피지 고형화를 방지하고 피지의 배출과 제거를 용이하게 하는데 있다. 피지의 원활한 피지의 제거는 탈모를 방지하고, 모근 세포들이 모세혈관으로부터 영양분을 용이하게 받아들이게 도와줌으로써 모근세포 및 관련주변세포를 활성화하여 모발의 성장을 빠르게 할 것으로 기대된다.
- [82] 난황이나 콩에서 추출한 인지질은 불포화지방산을 많이 함유하므로 산소접촉에 의해 쉽게 산패되어 산화적 스트레스(oxidative stress)를 모근세포 및 주변 관련 세포들에 줄 가능성이 높아지므로, 가능하면 불포화지방산을 함유하는 인지질(레시틴)을 사용하는 대신에 포화지방산을 많이 함유하는 동물의 폐에서 정제한 인지질을 이용하는 것이 바람직하다.
- [83] 본 발명은 2가 양이온과, 산도(pH)를 조절하는 동시에 칼슘에 의해 인지질이 뭉치는 것을 방지하기 위하여 유기산과 유기산 염( 짝산과 짝염기)을 함께 사용하는 조성물로 기존의 어떠한 인지질 관련 제품들과 확연히 다른 차별성을 갖는다. 이들 2가 이온과 유기산 및 유기산 염의 동시 사용은 구조적으로 안정한 리포솜을 제조하는 데는 불리하다. 그 이유는 극성이 강한 인지질의 머리 부위(head group)들이 극성을 서로 밀어내기 때문이다. DPPC(dipalmitoyl phosphatidylcholine)의 함량이 높을수록 리포솜의 구조적 안정성은 불리해진다. 그 예로 순수한 DPPC 성분의 리포솜(pure DPPC liposome)은 섭씨 4도씨에 보관 시, 2주 안에 모두 파괴되는 것으로 보고 되었다(Launois-Surpas et al. 1992. Colloid Polym. Sci. 270:901-911).
- [84] 본 발명은 두피 또는 표피에 존재하는 피지의 성질을 변화시킬 목적으로 인지질을 단순히 혼탁(suspension)한 형태로 적용하는 것을 선호한다. 리포솜 형태의 전달(delivery)은 구조가 안정할수록 두피나 피지선 근처에 노출된 피지와 쉽게 섞이지 않을 우려가 있기 때문이다.
- [85] 피지의 성질을 바꾸기 위하여 인지질을 적용하는 방식은, 다양한 지방산을 이용하여 적용하는 발모제(US patent no. US2007/0154432 A1) 보다 좋은 장점을

찾는다. 지방산은 세포지질막의 구조에 나쁜 영향을 줄 수 있을 뿐만 아니라 박테리아나 진균류의 에너지원으로 쉽게 이용될 가능성이 있기 때문이다. 또한 지방산의 중간 대사 산물들은 불쾌한 냄새를 띄는 성질이 있으므로 (예를 들어, 부티르산(butyric acid) 또는 프로피온산(propionic acid 등) 불편한 점이 있다. 게다가, 리놀레산(linoleic acid)은 인간의 세포에 의해 대사되어 아라키돈산(arachidonic acid)으로 변환되고 후에 류코트리엔-B4 (leukotriene-B4, LTB4) 또는 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2)로 최종 변환된다. 이들 두 물질은 염증반응을 증가시키는 역할을 하므로 장기 사용 시, 탈모를 부추길 가능성이 있다(Mahet al. 2000. International J. Dermatol. 39: 576-584). 지방산을 이용하는 발모 제품들은 초기에는 피지와 잘 융화되어 피지의 성질을 부드럽게 해 줌으로써 발모의 효과를 보여줄 수 있으나, 오랜 적용으로 누적이 일어나면 부정적인 기능도 나타낼 가능성이 있다는 것을 간과하면 안될 것이다.

- [86] 본 발명의 조성물 성분은 동물의 폐로부터 중성지방들과 펩타이드들(단백질들)을 제거하고 순수하게 얻어진 인지질과 2가 양이온 (예를 들어, 칼슘이온 또는/그리고 마그네슘이온) 및 유기산[예를 들어 구연산(citric acid/ citrate), 숙신산(succinic acid/ succinate) 또는 말산(malic acid/ malate)] 등 미토콘드리아의 트리카르복실산 회로(tricarboxylic acid cycle)에 사용되는 유기산들(짝산과 짝염기)을 포함하는 조성물로 피지선에서 분비되는 피지의 성질을 바꿔주어 피지의 배출과 제거를 용이하게 하고 탈모를 방지하며 모발의 성장 속도를 빠르게 하는 목적을 갖는다.

[87]

[88] 조성물의 다양한 응용

- [89] 본 발명의 조성물은 이론적으로나 실험적으로 표피에 산재되어 있는 줄기세포에 어떠한 영향이나 자극을 주어 새로운 모근이 형성되어 발모가 가능하게 하는 근거는 부족하거나 없다. 하지만, 본 조성물은 피지 성질을 변화시켜 피지의 배출과 제거를 용이하게 하여 결과적으로 모발이 빨리 성장하도록 한다는 것은 이론적으로도 또한 실험적으로도 증명이 가능하다.

- [90] 기존의 동물실험을 통하여 밝혀진 발모의 기작에 대한 결과로 볼 때, 모근 세포의 분화 및 발생은 상처가 생겼다가 아물면서 자연스럽게 발생(Cheng-Ming Chuong, 2007. Nature 447: 265-266 과 Ito et al. 2007. Nature. 447 316-320)한다는 것이다. 본 특허의 조성물을 두피에 미세한 상처를 준 후 적용한다면, 상처회복 과정에서 새롭게 분화한 모근세포들이 빠른 성장을 하고 모발을 안정적으로 키워나가게 할 수 있을 것이다. 발모의 목적보다 육모의 목적이 강하다고 볼 수 있다.

- [91] 다른 방식은, 미녹시딜이나 피나스테라이드의 적용 후 미세한 모발의 성장을 보이는 경우, 본 특허의 조성물을 적용하면 빠른 모발의 성장을 유도하여 모발 성장의 안정화를 도모할 수 있을 것으로 기대된다.

- [92] 본 특허의 조성물을 탈모가 진행 중인 사람들 중에 두피에 미세한 모발 (소위

숨털)이 존재한다면 적용시켜, 이들 미세 모발의 성장 속도를 빠르게 하여 탈모 증상을 완화시키는 데도 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

- [93] 더불어 암환자들이 화학요법을 시행하기 전후에 적용을 한다면 화학요법의 부작용으로 인한 탈모도 예방하고 또한 화학 요법 치료 종결 후 새로운 모발이 형성될 때 성장속도를 빠르게 하여 환자들의 회복에도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

### 발명의 효과

- [94] 본 발명의 명세서를 통하여 알 수 있는 바와 같이 본 발명은 동물로부터 정제된 인지질을 이용하여 중성지방 성분의 피지의 성질을 변화시켜, 피지 고형화를 방지하고 피지의 배출과 제거를 용이하게 한다. 피지의 원활한 피지의 제거는 탈모를 방지하고, 모근 세포들이 모세혈관으로부터 영양분을 용이하게 받아들이게 도와줌으로써 모근세포 및 관련주변세포를 활성화하여 모발의 성장을 빠르게 할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [95] 도 1-2는 돼지 폐에서 추출하여 정제된 인지질의 박막 크로마토그래피 분석에 관한 그림이다. 도1의 1번 시료, 실리카겔럼 전의 돼지 폐 추출 인지질; 2번 시료: 정제된 돼지 폐 추출 인지질; 3번 시료, PC (L-alpha-phosphatidylcholine, Sigma #P3556); 4번 시료, PI (phosphatidylinositol sodium salt, Fluka #79403); 5번 시료, PS (3-SN-phosphatidyl-L-serine sodium salt, Sigma#P5660); 6번 시료, PA (3-SN-phosphatidic acid sodium salt, Sigma#P9511) 7번 시료, PE (L-alpha-phosphatidyl ethanolamine, Sigma#P7943); 8번 시료, DPPC (1-2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, Sigma#P4329); 9번 시료, soy lecithin (Junsei Chemical #86015-1201, 일본). 박막 크로마토그래피(TLC)를 이용하여 정제된 인지질에 함유된 특정 인지질 종류를 알아보았다. 박막 크로마토그래피로 확인된 인지질은 DPPC, PC, PS, PI, PE 이다. 박막 크로마토그래피의 전개용매는 클로로포름: 메탄올: 물(65:25:4, 부피비)를 사용하였다. 에탄올에 녹인 5% 황산용액을 스프레이 한 후, 섭씨 190도로 가열하여 각 성분들을 탄화시켜 확인하였다.
- [96] 도 2의 1번 시료, 돼지 폐에서 정제된 인지질; 2번 시료, 대두 추출 인지질(soy lecithin, Junsei Chemical #86015-1201, 일본); 3번 시료, 난황 추출 인지질 (egg lecithin, Tokyo Chemical Industry #L0022, 일본). 돼지의 폐에서 추출된 인지질은 기존의 잘 알려진 레시틴과 확연히 다른 구성을 갖고 있음을 박막 크로마토그래피 방법으로 확인하였다.
- [97] 도 3-8은 모근(hair follicle)의 활성화 현상 확인 그림이다.
- [98] DNFB(2,4-dinitrofluorobenzene)감작 작용을 이용하여 염증을 일으킨 쥐의 등 표면에 돼지 폐 추출 인지질을 적용하여 염증의 감소를 확인하는 실험과정 중에, 모근 세포들의 성장이 활성화된 것을 우연히 확인하였다.

- [99] 도 3은 정상적인 등의 표피 조직; 도 4는 DNFB 만 처리한 쥐의 등 표피 조직; 도 5는 타크로리무스(상품명, 프로토펙: 아스텔라스 제약, 일본) 적용 후; 도 6은 텍사메타손(0.1% dexamethasone 에탄올 용액) 적용 후; 도 7은 돼지 폐 추출 인지질(10mg/ml)을 적용 후; 도 8은 돼지 폐 추출 인지질 (20mg/ml)을 적용 후. 적용기간은 15일이었다. 타원형 빨간색 점선 안쪽은 활성화된 다수의 모근 세포들을 보여 주고 있다. 전형적인 발모의 형태는 - 세포기저층의 함몰을 보이며 모근 세포가 분화되는 현상-(도5, 타크로리무스 적용)에서 일부 관찰되었다. 본 발명의 조성물 적용 후(도 7과 8), 세포기저층 밑에서 모근 세포들이 활성화된 모습을 보이며, 기존에 발표된 발모의 형태가 아닌 모근세포의 활성화를 보여주고 있다.
- [100] 도 9-11은 본 발명의 조성물의 쥐 털 성장 촉진 효과를 보여주는 그림.
- [101] 도 9는 실험쥐(Balb/c)를 제모 한 후, 2주간 식염수를 적용한 결과이다. 도 10은 같은 종, 같은 주령의 실험쥐를 제모 한 후, 2주간 조성물을 적용한 쥐의 상태이다. 확인한 쥐 털의 성장을 눈으로 확인할 수 있다.
- [102] 도 11은 실험쥐(C3H)를 제모 후 증류수를 적용한 쥐와 조성물의 적용한 쥐들로부터 털을 뽑아서 그 길이를 비교하였다. 조성물을 적용한 쥐들의 털(오른쪽)은 매우 빠른 털의 성장을 보이는 것을 확인하였다. 눈금자의 간격은 1mm를 나타낸다.
- [103] 도 12-16은 본 발명의 조성물의 인체 적용의 예를 보여주는 그림.
- [104] 탈모를 보이는 지원자들에게 5mg/ml의 인지질 농도를 함유하는 조성물을 적용하여 그 결과를 관찰하였다. 1일 2회, 2cm x 2cm의 탈모 부위에 1방울(50~60ml씩) 적용하고, 20초 정도 문지르도록 권장하였다. 도 12는 지원자 A의 적용 전의 모습; 도 13은 15주 후의 모습; 도 14는 20주 후의 모습. 도 15는 지원자 B의 적용 전의 모습; 도 16은 15주 적용 후의 모습을 나타낸다. 육안 관찰로도 조성물의 효과를 쉽게 분명하게 할 수 있다.
- [105] 도 17-24는 다양한 유기산 농도 및 유기산들의 조합을 함유하는 본 발명의 조성물의 효과를 나타내는 그림.
- [106] 실험쥐(C3H)의 제모된 등의 면적을 기준으로 털이 난 부분의 면적의 비율을 계산하여 육모 효과를 수치화하였다(실험예 4: 육모 효력실험: 동물실험 3 (유기산 효능 및 대두 레시틴의 효과) 내용 및 도표 참조).
- [107] 도 17은 증류수 만을 적용한 실험군; 도 18은 미녹시딜(5%)만 적용한 실험군; 도 19는 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl<sub>2</sub> + 2.5mM citrate/citric acid, pH5.8) 적용한 실험군; 도 20은 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl<sub>2</sub> + 5mM citrate/ citric acid, pH5.8) 적용한 실험군; 도 21은 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl<sub>2</sub> + 7mM citrate/ citric acid, pH5.8); 도 22는 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl<sub>2</sub> + 5mM citrate/citric acid + 5mM malate/ malic acid, pH5.8) 적용한 실험군; 도 23은 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl<sub>2</sub> + 2.5mM citrate/ citric acid + 2.5mM malate/ malic acid, pH5.8) 적용한 실험군; 도 24는 대두 레시틴 (soy lecithin) +1.5mM CaCl<sub>2</sub> + 5mM

citrate/ citric acid, pH5.8) 적용한 실험군. 조성물에 함유된 유기산으로 구연산의 농도가 5mM 일 때, 가장 좋은 효과를 나타냈으며, 다른 구연산 회로에 연관된 유기산(예, 말산, malic acid)과의 조합도 상대적으로 탁월한 털의 성장 효과를 나타내는 것으로 확인하였다.

[108] 도 25-27은 본 발명의 조성물에 함유된 2가 양이온의 효과를 나타내는 그림.

[109] 조성물에 함유된 5mM 농도의 구연산(citrate/ citric acid, pH5.8)을 대신하여, 5mM의 숙신산 (succinate/ succinic acid, pH5.8)을 첨가하였다. 실험쥐(Balb/c)에 3주간 적용 후, 변화된 조성물이 털의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 도 25는 증류수만 적용한 실험군; 도 26은 1.5mM  $\text{CaCl}_2$  + 5mM citrate/ citric acid (pH5.8)를 함유하는 조성물을 적용한 실험군(2.5주간 적용);도 27은 1.5mM  $\text{CaCl}_2$  + 5mM succinate/ succinic acid (pH 5.8)을 함유하는 조성물을 적용한 실험군. 숙신산을 함유하는 조성물을 적용한 쥐의 털 성장은 구연산을 함유하는 조성물을 적용한 쥐의 털 성장 상태보다 규칙적이지 못하고 질감도 거친 것을 발견하였다. 조성물에 함유되는 유기산으로서 구연산이 가장 바람직하다는 것을 알 수 있고, 숙신산도 털의 성장을 촉진하는 효과가 있다는 것을 확인하였다.

[110] 도 28-29는 본 발명의 조성물에 함유된 2가 양이온으로서 마그네슘 이온의 효과를 나타내는 그림.

[111] 조성물에 함유된 1.5mM  $\text{CaCl}_2$  대신, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ 를 첨가하여, 실험쥐(Balb/c)에 3주간 적용하였다. 대조 실험 동물군에는 증류수를 적용하였고(도 28), 효능군에는 20mg/ml의 돼지 폐 추출 인지질, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$  및 5mM Citrate/ citric acid (pH 5.8)를 적용하였다(도 29). 마그네슘 이온을 함유하는 조성물은 개체마다 다른 털의 성장 형태를 보여줬다. 조성물에 함유된 2가 양이온으로는 칼슘이온이 가장 효과적으로 털의 성장을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었고, 마그네슘 이온도 털 성장에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

[112] 도 30-31은 본 발명의 조성물의 제형에 관한 실험이다.

[113] 도 30의 가운데 시험관은 정제된 인지질이 1.5mM 염화칼슘에 의해 뭉쳐지는 현상을 보여 주고 있다. 도 30의 오른쪽은 5mM의 구연산(citric acid/ citrate, pH5.8)이 첨가되어 칼슘에 의해 인지질이 뭉치지 않게 된 상태이다. 도 30의 왼쪽은 조성물을 증류수에 혼탁한 결과이다. 조성물에 함유된 유기산이 모발의 성장 촉진에 중요한 역할을 하지만, 조성물이 균질한 혼탁 상태를 유지하는 데에도 필수적인 요소라는 것을 보여준다. 증류수에서는 반투명의 우유 빛갈색의 용액을 형성하여 리포솜형성을 판단할 수 있다. 하지만, 5mM 구연산/ 구연산염 + 1.5mM 염화칼슘을 섞은 용액(오른쪽 시험관)은 혼탁상태는 균질하지만, 불투명하며 스푼모양의 형태의 입자들이 관찰되어 리포솜 형성이 안되어 있다고 판단된다(사진으로 판단하기에 오른쪽 시험관이 불투명하다는 것으로 구별).

[114] 도 31은 폐에서 추출한 인지질을 이용하여 리포솜 구조를 형성시키기 위하여, 원형 플라스크에 지질 필름을 형성한 후, 강력한 혼합 과정(vigorous vortex)을

거쳐 리포솜 형성을 시도한 결과이다. 똑같은 과정을 거친 대두 레시틴(soy lecithin)은 반투명한 리포솜 용액 상태를 유지하는 반면(도 31 왼쪽), 동물 폐에서 추출한 인지질은 1시간 방치했을 때, 다량의 거품과 침전을 보이는 결과를 보였다(도 31 오른쪽). 본 발명에 사용된 인지질과 용액의 조건은 리포솜 형성에 유리하지 않은 조건으로 판단할 수 있다.

[115]

### 발명의 실시를 위한 형태

[116] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[117] 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[118]

[119] 실시예 1: 돼지 폐로부터 인지질의 정제

[120] 위해요소중점관리기준 (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point) 인증을 받은 도축장에서 돼지가 도축된 후, 즉시 허파 조직을 얻어 얼음-물 수조에 보관하였다. 돼지 폐 조직은 도축 후 5시간 이내에 사용하거나, 즉시 사용하지 않을 경우 섭씨 영하20도에 보관하였다가 필요 시에 해동시켜 사용하였다.

[121] 인지질 추출과정은 다음과 같은 순서의 과정을 거쳐 얻어졌다.

[122] ① 돼지 폐조직 파쇄 과정, ② 폐 조직으로부터 혈액 제거과정, ③ 전체 지질 침전과정 ④ 전체 지질(total lipid)의 유기용매 추출과정 ⑤ 중성용매를 이용한 중성지방 제거과정 ⑥ 잔류 중성지방 및 펩티드와 단백질 제거를 위한 실리카 컬럼 정제 과정, ⑦ 유기용매 제거 및 건조과정으로 이루어져 있다.

[123] ① 돼지 폐 조직의 파쇄 과정

[124] 돼지의 폐 조직으로부터 단단한 조직들(예를 들어 기관(trachea)이나 두꺼운 혈관들(aorta 및 pulmonary artery 등))을 제거하고 약 4x4x4cm의 크기로 절단한 후 육절기(grind mill)를 이용하여 돼지 폐 조직을 파쇄하였다. 파쇄한 조직(250g)에 냉각된 식염수(700ml)를 첨가한 후, 믹서기(metal-blade blender, HMF-390, 한일전기, 대한민국)를 이용하여 1분간 추가 파쇄하였다.

[125] ② 혈액 제거 과정

[126] 믹서기로 파쇄한 폐 조직은 얼음-물 수조에 넣어 1시간 동안 냉각시켰다. 냉각된 폐 조직을 섭씨 4도, 4,500g에서 40분간 원심분리(Component-R, 한일과학, 대한민국)하여 침전물을 취하고 상층액의 회색된 혈액은 제거하였다.

[127] ③ 전체지질 침전과정

[128] 얻어진 침전물에 5mM CaCl<sub>2</sub>를 함유하는 저장액(70mM NaCl)을 첨가한 후, 얼음-물 수조에서 1시간 동안 냉각시켰다. 냉각시킨 시료를 섭씨 4도, 4,500g에서 45분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 칼슘이온은 폐 조직 고유의 단백질들과 인지질들의 뭉침을 유도하여 낮은 원심분리 중력(g) 값에도 쉽게 침전을 유도하기 위하여 사용되었다.

[129] ④ 유기용매 추출과정

[130] 얻어진 침전물에 4배 부피에 해당하는 염화메틸렌(dichloromethane): 에탄올(ethyl alcohol)(2:1, 부피비) 혼합 용매를 부어 수용성 물질들을 제거하고 유기용매 용해성 물질(인지질을 함유하는 전체 지질)을 얻어냈다. 용매는 진공 회전 증발기를 이용하여 제거하고 함유지질물질들을 농축하였다.

[131] ⑤ 실리카 컬럼 정제과정

[132] 농축된 인지질을 함유하는 분획을 염화메틸렌에 다시 녹인 후, 실리카 컬럼에 적용하여 시료에 함유된 콜레스테롤, 트리아실글리세롤 및 지방산등의 중성지방들을 제거하고 인지질을 순수하게 얻어내었다. 지름과 높이 비율이 1:4인 유리 컬럼을 사용하였고, 실리카젤은 머크(Merck) 230-400메쉬(mesh)를 사용하였다. 비극성 또는 중성 용매를 초기에 사용하고 극성도가 높은 전개용매를 순차적으로 사용함으로써 컬럼 초기에 중성지방을 먼저 용출시키고, 마지막 부분에 극성 지방들이 용출되게 하여 정제를 용이하게 하였다. 실리카젤 1 부피의 아세톤, 실리카젤 1부피의 염화메틸렌을 순차적으로 사용하고, 인지질을 얻어내기 위하여 염화메틸렌: 에탄올: 물(6:8:1, 부피비)을 실리카젤 부피의 7배를 사용하여 컬럼을 전개시켰다. 용출되는 분획을 박막 크로마토그래피(TLC)에 적용하여 인지질의 용출을 확인하였고, 박막 크로마토그래피에서  $R_f$  값이 0.3 이상 0.7 이하의 지질 분획(인지질의  $R_f$  값)을 선별하여 얻어냈다. 박막 크로마토그래피의 전개 용매로는 클로로포름: 메탄올: 물(65:25:4, 부피비)를 사용하였다.

[133] ⑥ 유기용매 제거 및 건조과정

[134] 얻어진 최종 인지질 분획으로부터 진공회전증발기를 이용하여 유기용매를 제거하였다. 얻어진 인지질의 고형물에 다시 순수한 에탄올을 첨가한 후 재증발시키는 과정을 거쳐 염화메틸렌이 남아있을 가능성을 제거하였다. 최종적으로 섭씨 영하 85도의 동결건조기를 이용하여 잔여 수분을 제거 후 가루 형태의 인지질을 얻어냈다.

[135] ⑦ 정제된 인지질의 확인

[136] 정제된 인지질의 순도는 박막 크로마토그래피(TLC, Thin layer chromatography)법을 이용하여 확인하였다. 박막 크로마토그래피의 박막 위에 존재하는 지질들은 에탄올에 녹인 5% 황산(sulfuric acid)을 분무한 후에, 섭씨 190도에서 탄화(charring)시켜 발색이 되도록 하였다. 박막 크로마토그래피의 전개용매(developing solution)는 클로로포름:메탄올:물(65:25:4, 부피비)을 사용하였다. 전개용매는 극성을 강하게 띠는 용매로서 지방산 및 콜레스테롤 등의 중성지방들은 높은 이동률( $R_f$  값은 0.8이상)을 가지며, 단백질들 또는 펩티드들은 시료를 점적한 곳에서 거의 이동하지 않는다( $R_f$  값은 0.1이하). 인지질은 0.3~0.76의  $R_f$  값을 갖는다. 박막 크로마토그래피법을 이용하여 정제된 인지질에는 DPPC(dipalmitoyl phosphatidyl choline), PC(phosphatidyl choline), PS(phosphatidyl serine), PE(phosphatidyl ethanolamine), PI(phosphatidyl inositol),

PA(phosphatidic acid)가 함유되어 있는 것을 확인하였다(도 1).

- [137] 폐에서 추출한 인지질(레시틴)은 대두 인지질(soy lecithin) 또는 난황 인지질(egg lecithin)의 성분과는 확연히 다른 구성 성분의 인지질들을 갖는 것을 박막 크로마토그래피 분석을 통하여 확인하였다(도 2).
- [138] 에탄올에 녹인 0.2% 닌히드린(ninhydrine)을 박막 크로마토그래피에 분무하여 시료에 함유된 단백질들 또는 펩티드들이 존재하는지 확인하였다. 닌히드린으로 염색한 박막 크로마토그래피에서 단백질들 또는 펩티드들은 검출되지 않았다(결과 생략).
- [139] 시료의 총 인지질의 농도는 Fiske and Subbarow reagent를 사용하는 개량된 바틀렛 실험법(modified Bartlett assay, Miller KJ. 1985. J. Bacteriol. 162: 263-270)을 이용하여 정량을 하였고, 시료에 함유된 폐 고유의 인지질인 DPPC의 함량은 고압액체크로마토그래피법과 이엘에스 감지기를 연계한 시스템(HPLC-ELS (Evaporative light Scattering) Detector system, Waters e2695 module system, USA)을 이용하여 정량하였다. L-a-dipalmitoyl phosphatidyl choline, Sigma Chem.. Co. USA)를 구입하여 농도의 정량에 사용하였다. 전체 시료에 함유된 DPPC의 양은 약 32%로 확인되었다(결과 생략)

[140]

[141] 실시에 2: 조성물의 제조

- [142] 정제된 인지질은 파우더 형태로 존재하므로 표피에 적용하기 위하여 물에 혼탁하여 사용 하였다. 물에 혼탁된 인지질은 섭씨 121도, 15lb/cm<sup>2</sup>의 압력으로 15분간 고압멸균 (autoclave)을 하였다. 보조인자로 사용하기 위해 첨가되는 2가 양이온 (염화칼슘 또는 염화마그네슘) 및 유기산 (구연산 및 말산 등)은 농축용액으로 만들어 각각 고압멸균 한 후, 혼탁된 인지질 용액에 첨가하여, 요구되는 농도가 되도록 섞어 주었다. 유기산의 제조는 산 형태 (acid form, 예: citric acid)와 염 형태(sodium salt form, 예: citrate tri-sodium salt)를 섞어 산성도(pH)가 5.8이 되는 완충용액으로 작동하도록 하였다. 효능검증을 위하여 적용된 인지질 농도는 5mg/ml, 10mg/ml 및 20mg/ml을 각각 사용하였고, 2가 양이온의 농도는 1.5mM, 유기산의 농도(유기산과 유기산 염의 농도의 합)는 최종농도가 5mM이 되도록 하였다.

[143]

[144] 실험예 1: 육모 효력실험: 동물 실험1 (육모 효과의 발견)

- [145] 아토피성 피부염 또는 접촉성 및 알러지성 피부염의 동물모델을 만들기 위하여, DNFB로 감작시킨 1주일 후부터, 주 2회씩 총 10회의 DNFB를 쥐의 등에 발라주어 인위적인 알러지성 염증을 유발하였다. 피부염 발현 동물모델 제작 및 치료제와 효능을 보이는 물질들의 투여 방법은 이전에 출판된 논문(Inagaki et al. 2006, Eur J Pharmacol 546:189-196)의 방법을 따라하였다. 쥐는 Balb/c를 사용하였고 6마리를 한 그룹으로 설정하였다. 5회차 DNFB를 적용한 이후부터 본 특허의 조성물, 타크로리무스(Tacrolimus, 상품명: 프로토픽,

한국아스텔라스제약) 연고 및 텍사메타손(Sigma Chem. Co. USA, 에탄올에 녹인 0.1% 용액)을 각각 염증이 발생한 쥐의 등에 1일 2회, 60 마이크로리터(ml)씩 적용하였다. 적용 10일 후 쥐의 조직을 채취하여 검사를 실행하였다.

- [146] 본 발명의 조성물을 적용한 쥐의 조직들(10mg/ml 인지질 농도(도 7)와 20mg/ml의 인지질 농도(도 8)에서 활발한 모근 세포의 성장이 관찰되었고 증류수(도 3)와 텍사메타손(도 6)을 적용한 쥐의 조직들에서는 모근의 발달이 관찰되지 않았다. 쥐 등의 상처가 치유되는 과정에서 기저세포층(basal cell membrane)의 줄기세포가 모근세포로 분화하면서 함몰(또는 구형형태로 내려앉는 형태)되어 새로운 모근이 형성되는 현상은 타크로리무스(도 5)를 적용한 쥐의 조직에서 관찰되었으나, 본 조성물을 적용한 쥐의 조직에서는 기저세포층의 밑에서 모근세포들이 성장한 모습을 볼 수 있다. 이러한 관찰 결과는 본 발명의 조성물이 발모의 기능보다는 육모의 기능을 갖는다고 추론할 수 있는 근거가 된다.

[147]

[148] 실험예 2: 육모 효력실험: 동물 실험2 (털의 성장 속도 비교 실험)

- [149] 동일한 주령의 수컷 실험쥐들(5주차, balb/c)을 구입(오리엔탈바이오, 성남시, 경기도, 대한민국)하여 1주일간 새로운 환경에 적응하도록 하였다. 음식과 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였고, 오전 8시에 소등하고 오후 8시에 점등하여 생활주기 리듬(circadian rhythm)을 맞춰주었다. 습도, 온도, 공기 청정 및 순환은 동물사육기(DJ-201, 대중기기, 서울, 대한민국)를 이용하여 섭씨 25도, 50%의 습도에서 사육하였다. 5마리를 하나의 실험군으로 구성하여 실험을 수행하였다.

- [150] 같은 주령(6주)의 수컷쥐의 등을 제모한 후, 본 조성물을 적용하여 털의 성장을 관찰하였다. 대조군에는 조성물 대신 같은 양의 증류수를 적용하고 같은 횟수로 문질러 주었다(도 9). 조성물은 20mg/ml의 인지질을 1.5mM의  $\text{CaCl}_2$ 와 5mM의 구연산/구연산염(citric acid, free-salt와 citrate tri-sodium salt, pH5.8)을 함유하는 용액에 단순 혼합한 조성물을 60ml씩 1일 2회, 2주간(토, 일요일을 제외한 총 10일) 적용하였다(도 10). 2주 후, 두 실험군의 차이는 확연하게 나타났다(도 9와 도 10).

- [151] Balb/c 실험쥐 외에도 C3H 실험쥐를 이용하여 모발 성장 속도를 비교하여 보았다. 조성물을 적용한 쥐의 털과 증류수만 적용한 쥐의 털을 뽑아서 길이를 비교하였다. 2.5주의 적용기간 후, 두 실험군의 털의 성장 길이는 확연한 차이를 보였다. 도 11은 두 실험군에서 채취한 털의 길이를 보여주며 눈금은 1mm의 간격을 나타낸다.

[152] 실험예 3: 육모 효력실험: 지원자 테스트

- [153] 대머리가 진행 중이거나 상당히 많이 진행된 테스트 지원자들을 선별하여, 5mg/ml 인지질 농도를 갖는 본 특허의 조성물을 적용하였다. 발모에 관련되어 영향을 줄 수 있는 약을 복용하거나 두피에 적용하고 있는 지원자는 테스트에서 제외하였다. 13명의 지원자를 선별하여 지원자 테스트를 실행하였고, 15~20주의

테스트 기간의 종료까지 참여한 지원자는 7명이 있었다. 평균나이는 37세였다. 본 특허의 조성물을 1일 2회, 2cm x 2cm의 탈모부위에 1방울(약 50~70ml)씩 점적하고 20초간 두피를 문지르도록 권장하였다. 샴푸, 세제 사용 및 음식, 알코올 섭취 또는 흡연에 대하여 어떠한 절제나 권장을 하지 않고 일상 생활을 하는 상태에서 조성물을 적용하도록 하였다.

[154] 지원자들로부터, 조성물 적용 후, 탈락감소, 머리 술의 증가, 머리털의 성장속도 및 털의 굵기의 변화에 대하여 4가지 질문을 하였고, 각각의 질문 항목에 대하여 만족도를 최대 0-5점으로 지원자 스스로 평가를 하도록 하였다.

[155] 표 1

[Table 1]

|                                    | 머리카락의<br>탈락 감소 | 머리카락의<br>굵기 변화 | 머리 술의<br>증가 | 머리카락의<br>성장 속도 |
|------------------------------------|----------------|----------------|-------------|----------------|
| 지원자의 자가<br>평가 점수 (0-5점,<br>n=7) 평균 | 3.5            | 2.9            | 3.0         | 3.7            |

[156] 조성물을 적용한 후, 지원자 스스로 평가를 내리도록 하여 얻은 결과는 주관적인 견해로 인하여 보편적 정확성을 보장할 수는 없지만, 조성물에 대한 효과에 대하여 지원자의 만족도가 높다는 것을 알 수 있었다. 지원자들의 평가 결과는 발명자가 조성물의 효과가 발모 보다는 육모 또는 탈모방지에 있을 것이라 추론한 결과를 입증해 주었다. 지원자에 대한 적용 결과는 사진을 통해 쉽게 육안으로 확인할 수 있다 (도 12-16).

[157] 실험예 4: 육모 효력실험: 동물실험 3 (유기산 효과 및 대두추출 인지질의 효과)

[158] 본 발명의 조성물에 함유된 유기산 (예, citric acid free-salt 와 citrate tri-sodium salt)이 육모의 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 또한 같은 농도의 대두 레시틴 (콩에서 추출한 인지질, #86015-1201, Junsei Chemical, Japan)을 이용한 조성물을 제조하여 털 성장에 주는 영향을 비교하였다. 실험 쥐는 7주령의 C3H/HeNCrljBgi 종을 구입(오리엔트바이오, 성남, 한국)하여 실험에 사용하였다. 5마리의 쥐를 한 그룹으로 구성하여 실험을 하였다. 실험 결과의 확인한 차이를 보기 위하여 미녹시딜(5% 용액, 마이녹실, 한미약품, 한국)을 모든 쥐에 60ml씩 적용하고(그룹1 제외) 30분 후에, 본 특허의 조성물을 적용하였다. 조성물의 적용은 2.5주간 수행하였고, 1일 2회 60ml씩 제모된 쥐의 등에 적용을 하였다. 적용된 인지질의 농도는 20mg/ml였다. 쥐의 모발이 성장의 측정은 각 실험군의 쥐들의 사진을 각각 촬영한 후, 제모 된 부위에서 털이 자란 부위가 차지하는 비율을 계산하였다. 그 결과는 다음의 표와 같다.

[159] 표 2

[Table 2]

| 동물<br>군 | 적용 성분                                                                    | 털 성장<br>면적 |
|---------|--------------------------------------------------------------------------|------------|
| 그룹1     | 증류수 적용 (도5a)                                                             | 0          |
| 그룹2     | 미녹시딜(5%) 적용 (도5b)                                                        | 10.2       |
| 그룹3     | 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl <sub>2</sub> + 2.5mM citrate (도5c)                | 77.4       |
| 그룹4     | 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl <sub>2</sub> + 5 mM citrate (도5d)                 | 83.4       |
| 그룹5     | 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl <sub>2</sub> + 7mM citrate (도5e)                  | 59.5       |
| 그룹6     | 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl <sub>2</sub> + 5mM citrate + 5mM malate (도5f)     | 73.9       |
| 그룹7     | 돼지 폐 추출 인지질+1.5mM CaCl <sub>2</sub> + 2.5mM citrate + 2.5mM malate (도5g) | 36.7       |
| 그룹8     | 대두추출인지질(soy lecithin) +1.5mM CaCl <sub>2</sub> + 5 mM citrate (도5h)      | 27.9       |

[160] 실험쥐의 털 성장 속도를 빠르게 하기 위해서, 조성물은 돼지 폐에서 추출한 인지질을 사용하는 것이 가장 바람직하며, 조성물의 구연산의 농도가 5mM일 때 가장 좋은 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(도 20). 대두에서 추출한 인지질(대두 레시틴)도 쥐의 털의 성장 촉진에 도움을 주는 것으로 확인 되었으나, 돼지의 폐에서 추출한 인지질이 갖는 털 성장 촉진 효과에 비교하면 큰 의미를 갖기 어렵다고 판단된다.

[161] 추가적으로 조성물에 말산 (malate/malic acid)를 추가하여 조성물의 효과를 조사해 보았다. 미토콘드리아의 구연산회로(TCA cycle)에 관련된 유기산은 모발의 성장에 도움을 준다는 것을 알 수 있었고, 지질대사와 관련이 깊은 미토콘드리아의 생리적 활성이 모발의 성장과 관련되어 있을 거라는 가설을 추론 가능하게 하는 결과를 얻었다(도 17-24).

[162]

[163] 실험예 5:육모 효력실험: 동물실험 4 (구연산 과 숙신산의 비교)

[164] 본 발명의 조성물에 함유된 구연산 대신, 미토콘드리아의 구연산 회로(citric acid cycle)의 다른 대표적인 유기산인 숙신산(succinate di-sodium salt/ succinic acid, pH5.8)을 조성물에 같은 농도(5mM)로 첨가하여 모발 성장에 미치는 영향을

조사하였다. 9주령의 Balb/c 실험쥐를 사용하였으며, 앞서 기술된 똑같은 방법으로 수행하였고 적용 기간은 2.5주였다. 숙신산도 구연산과 유사하게 쥐 털의 성장 촉진을 보여주었다(도 27). 하지만 숙신산을 함유하는 조성물은 구연산을 함유하는 조성물(도 26) 보다 불규칙한 털의 성장을 보이고 쥐의 털이 거칠어 보이는 질감을 나타내었다. 하지만 숙신산을 첨가한 조성물을 적용한 쥐에서 부분적으로 구연산을 함유하는 조성물의 털 성장 속도보다 더 빠른 성장을 보이기도 하였다. 조성물에 함유된 유기산은 칼슘에 의한 인지질의 뭉침(aggregation)현상을 방지하는 데도 필수적인 동시에 털의 성장을 조절하는 중요한 요소라는 것을 보여주고 있다.

[165] 실험예 6: 육모 효력실험: 동물실험 5 (2가 양이온, 칼슘 이온과 마그네슘 이온의 영향)

[166] 본 발명의 조성물에 함유된 2가 양이온인 칼슘 이온 대신, 마그네슘 이온을 첨가하여 쥐의 털 성장 속도에 미치는 영향을 조사하였다. 6주령의 Balb/c 실험쥐를 이용하였으며, 1일 2회씩 3주간(15일), 조성물 50ml씩 쥐의 등에 적용하였다. 조성물은 20mg/ml 인지질, 1.5mM  $MgCl_2$  및 5mM 구연산(citric acid/citrate sodium salt, pH5.8)을 함유하도록 하였다.

[167] 3주의 조성물 적용 기간 후 관찰한 결과, 마그네슘 이온도 쥐의 털 성장 속도를 촉진한다는 것을 알 수 있었다. 하지만, 칼슘이온을 첨가한 조성물의 효과보다 만족스러운 결과를 보여주지 못했다. 칼슘이온을 함유하는 조성물은 실험군의 모든 쥐들에서 규칙적인 털의 성장을 보이는 반면에, 마그네슘 이온을 함유하는 조성물은 개체에 따라 불규칙한 털의 성장을 보여주었다. 실험을 통하여, 쥐의 털 성장을 촉진하는 조성물에 함유되는 2가 양이온으로는 칼슘 이온이 가장 적합하다는 결론을 내릴 수 있었으며, 마그네슘 이온도 쥐의 털 성장을 촉진시키는 역할을 할 수 있다는 가능성을 보여주었다(도 28-29).

[168] 실험예 7: 조성물의 제형 관찰 실험(칼슘 이온과 유기산의 조합)

[169] 본 발명의 조성물은 폐에서 추출한 인지질과 염화칼슘 및 유기산(구연산 + 구연산염)을 함유한다. 특히 유기산은 모발의 성장을 빠르게 하는 중요한 인자인 동시에, 칼슘 이온에 의해 인지질이 뭉치는 현상을 방지하는 역할도 한다. 본 실험은 조성물에 함유된 유기산이 칼슘이온에 의해 인지질이 뭉치는 현상을 방해한다는 것을 증명하기 위하여 실행하였다. 유기산이 조성물에 필수적으로 함유되어야 피부적용이 용이할 수 있다는 것을 명확히 판단할 수 있게 한다.

[170] 10mg/ml의 인지질을 증류수에 혼탁시킨 상태(도 30 왼쪽), 인지질 혼탁액에 1.5mM 농도가 되도록 염화칼슘 만을 첨가한 상태(도 30 가운데), 인지질 혼탁액에 1.5mM의 염화칼슘 및 5mM citrate/citric acid를 첨가한 상태(도 30 오른쪽)를 만들어 보았다. 염화칼슘만 함유된 시험관에서는 인지질의 뭉침 현상을 보였고, 유기산과 칼슘이 함께 함유된 시험관에서는 인지질이 균질하게 혼탁된 상태를 볼 수 있다.

[171] 돼지 폐에서 추출한 인지질의 리포솜 형성 조건에 대하여 조사하였다. 폐에서

추출한 인지질에 클로로포름: 메탄올(1:2, 부피비)를 첨가한 후, 진공 회전 증발기(Eyela N-1000, rotary vacuum evaporator, 일본)를 이용하여 플라스크의 벽에 박막의 지질 필름을 형성시켰다. 인지질 필름이 형성된 둥근 플라스크에 본 특허의 조성 성분인 1.5mM 염화칼슘과 5mM 구연산(citric acid/ citrate tri-sodium salt, pH5.8)을 첨가한 후, 30분간 세게 흔들어 리포솜 형성을 시도하였다. 리포솜 형성 시, 플라스크를 일정 간격으로 가열하여 약 섭씨 60도를 유지하도록 하였다. 폐에서 추출한 인지질은 대두 추출 인지질 (대두레시틴)과 달리 거품 형성을 보이며 1시간 상온 방치하였을 때, 쉽게 침전되는 것을 보였다. 본 특허의 조성물에 적용된 조건은 리포솜 형성에 유리한 조건이 아니라고 판단된다. 돼지의 폐에서 추출한 인지질은 포화도가 높아 탄화수소 꼬리(hydrocarbon tails)의 유동성이 적고 인지질의 머리부분의 극성이 높아 서로 정전기적 밀어내는 성질(electrostatic repulsion)이 강해서 이러한 특성을 나타내는 것으로 추론된다. 본 조성물은 건강한 동물의 폐에서 추출한 인지질을 단순한 혼탁형태로 사용하기를 권장하며, 이러한 비리포솜 형태(non-liposomal structure)의 인지질 함유 조성물은 점도가 높아진 피지와 보다 쉽게 섞일 수 있으므로 피지의 점도를 빠르게 낮춰주고 더불어 피지의 배출 및 제거를 용이하게 할 수 있을 것으로 기대된다.

[172]

## 청구범위

- [청구항 1] 유효성분으로 인지질을 포함하는 탈모방지 또는 육모 촉진용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 인지질은 동물로부터 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 인지질은 소 또는 돼지로부터 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 2항 또는 제 3항에 있어서, 상기 인지질은 동물의 폐로부터 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인지질은 다이팔미토일포스파티딜콜린, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 세린, 포스파디드산, 및 포스파티딜 이노시톨로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 2가 양이온 및 카르복실기 함유 유기산 또는 그의 염으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 헤어토닉, 헤어크림, 헤어로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어스프레이, 헤어에어줄, 포마드, 분말, 또는 젤인 것을 특징으로 하는 조성물.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



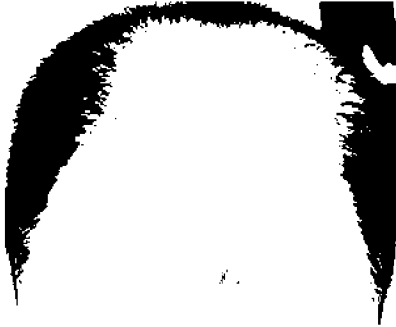
[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



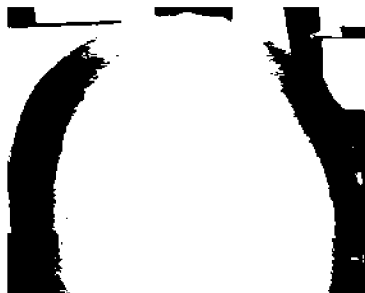
[Fig. 14]



[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]



[Fig. 22]



[Fig. 23]



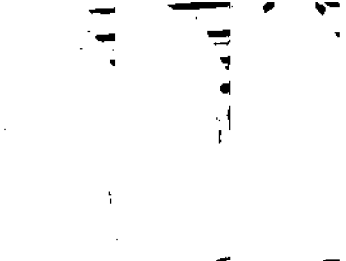
[Fig. 24]



[Fig. 25]



[Fig. 26]



[Fig. 27]



[Fig. 28]



[Fig. 29]



[Fig. 30]



[Fig. 31]

