

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-546381
(P2024-546381A)

(43)公表日 令和6年12月20日(2024.12.20)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/074(2010.01)	C 1 2 N	5/074	4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/28 (2015.01)	A 6 1 K	35/28	4 C 0 8 3
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14	4 C 0 8 7
A 6 1 K	8/98 (2006.01)	A 6 1 K	8/98	
A 6 1 Q	7/00 (2006.01)	A 6 1 Q	7/00	
		審査請求 有	予備審査請求 未請求	(全25頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-538423(P2024-538423)	(71)出願人	518357128	
(86)(22)出願日	令和4年12月23日(2022.12.23)		イファ ユニバーシティーインダストリー	
(85)翻訳文提出日	令和6年7月24日(2024.7.24)		コラボレーション ファウンデーション	
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/021214		EWHA UNIVERSITY – I	
(87)国際公開番号	WO2023/121400		NDUSTRY COLLABORAT	
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)		ION FOUNDATION	
(31)優先権主張番号	10-2021-0187682		大韓民国 ソウル 03760、ソデムン	
(32)優先日	令和3年12月24日(2021.12.24)		ーグ、イファヨデーギル 52	
(33)優先権主張国・地域又は機関			52, Ewhayeodaegil	
	韓国(KR)		Seodaemun-gu Seoul	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(71)出願人	521129141	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		ヒエラバイオ インコーポレイテッド	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		大韓民国 03760 ソウル ソデムン	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			最終頁に続く
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			
	最終頁に続く			

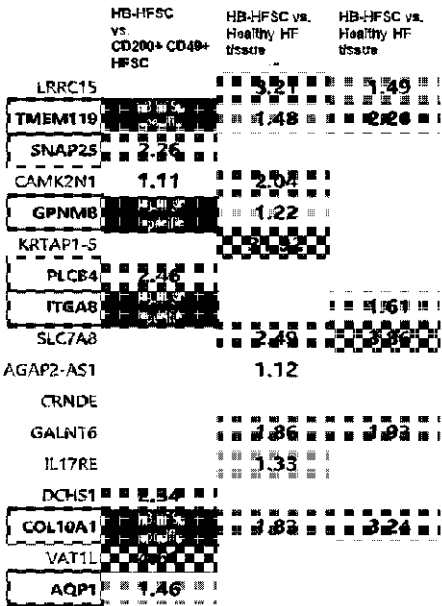
(54)【発明の名称】 毛包由来幹細胞の培養方法及びその用途

(57)【要約】

本発明は、毛包由来幹細胞の培養方法及びその用途に関し、毛包由来幹細胞の培養方法；前記方法で製造された毛包由来幹細胞；前記製造された毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛治療または発毛促進用薬学組成物；医薬部外品組成物；及び化粧料組成物に関する。

本発明の培養方法によると、毛包組織から効果的に幹細胞を分離及び得ることができ、前記得られた毛包由来幹細胞は、多分化能と自己複製能に優れ、脱毛治療及び発毛促進効果に優れるため、脱毛改善、予防または治療用途として有用に活用できるものである。

【選択図】なし



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 毛包組織をハイドロゲル内に取り込んで培養して培養物を得る段階；及び

(b) 前記で得られた培養物においてハイドロゲルを分解して前記毛包組織からハイドロゲル内に移動及び増殖した幹細胞を回収する段階を含む、毛包由来幹細胞の培養方法。

【請求項 2】

前記 (a) 段階は、毛包組織をハイドロゲル二重層の間に取り込んで培養するものである、請求項 1 に記載の毛包由来幹細胞の培養方法。

【請求項 3】

前記毛包組織は、表皮 (epidermal) から毛包漏斗部 (follicular infundibulum) に該当する部位を除去した切片を用いるものである、請求項 1 に記載の毛包由来幹細胞の培養方法。

10

【請求項 4】

前記 (a) 段階で毛包組織の培養は、3 日～20 日である、請求項 1 に記載の毛包由来幹細胞の培養方法。

【請求項 5】

前記 (a) 段階で毛包組織の培養は、組織間の間隔が 1 mm 以上 50 mm 以下で播種されるものである、請求項 1 に記載の毛包由来幹細胞の培養方法。

【請求項 6】

前記毛包由来幹細胞は、SANP25、COL10A1、TMEM119、AQP1、PLCB4 及び ITGA8 から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子発現が増加したものである、請求項 1 に記載の毛包由来幹細胞の培養方法。

20

【請求項 7】

前記毛包由来幹細胞は、CD73、CD90、CD105、Nestin 及び Lgr5 が発現し、

CD34、CD45 及び HLA-DR は発現しない免疫学的特性を有するものである、請求項 1 に記載の毛包由来幹細胞の製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法で製造された毛包由来幹細胞。

【請求項 9】

前記毛包由来幹細胞は、SANP25、COL10A1、TMEM119、AQP1、PLCB4 及び ITGA8 から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子発現が増加したものである、請求項 8 に記載の毛包由来幹細胞。

30

【請求項 10】

前記毛包由来幹細胞は、CD73、CD90、CD105、Nestin 及び Lgr5 が発現し、

CD34、CD45 及び HLA-DR は発現しない免疫学的特性を有するものである、請求項 8 に記載の毛包由来幹細胞。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法で製造された毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛治療または発毛促進用薬学組成物。

40

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法で製造された毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛改善または発毛促進用医薬部外品組成物。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の方法で製造された毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛改善または発毛促進用化粧品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、毛包由来幹細胞の培養方法及びその用途に関し、毛包由来幹細胞の培養方法；前記方法で製造された毛包由来幹細胞；前記製造された毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛治療または発毛促進用薬学組成物；医薬部外品組成物；及び化粧品組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

幹細胞 (stem cell) とは、組織を構成する各細胞に分化する前段階の細胞であり、未分化状態で無限増殖が可能であり、特定の分化刺激により多様な組織の細胞に分化し得る潜在的可能性を有する細胞をいう。

10

【0003】

幹細胞は、分化の可能性に応じて大きく胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES cell) と成体幹細胞 (adult stem cell (組織特異的幹細胞 (tissue specific stem cell))) に分けられる。胚性幹細胞は、受精卵が形成された後、子宮内膜に着床する前の初期段階である胚盤胞 (blastocyst) 胚中の胎児になる細胞塊 (inner cell mass: ICM) から分離した幹細胞であり、全ての組織の細胞に分化し得る潜在力を有している細胞である。

【0004】

一方、組織特異的幹細胞は、胚発生過程が進行されて胚の各臓器が形成される段階で現れる各臓器に特異的な幹細胞であり、その分化能が一般にその組織を構成する細胞のみに限定 (multipotent) される。代表的な組織特異的幹細胞は、骨髄 (bone marrow) に存在する造血幹細胞 (hematopoietic stem cell) と血球細胞以外の結合組織 (connective tissue) 細胞に分化する間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell) がある。造血幹細胞は、赤血球、白血球など各種血球細胞に分化され、間葉系幹細胞は、骨芽細胞 (osteoblast)、軟骨芽細胞 (chondroblast)、脂肪細胞 (adipocyte) 及び筋芽細胞 (myoblast) などに分化する。

20

【0005】

近来、ヒトから胚性幹細胞分離が成功した後、その臨床的適用に関心が高まっている。幹細胞の適用分野として最も注目されているのは細胞代替療法のための細胞供給源としての利用である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】韓国公開特許公報 10-2014-0075469 A

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

既存の毛包幹細胞分離方法は、コラゲナーゼ (collagenase) などを利用した酵素的分離方法 (韓国公開特許公報 10-2014-0075469 A) であり、細胞表面のタンパク質損傷が避けられないため、細胞性能に影響を及ぼす短所があり、皮膚幹細胞の分離及び培養方法に関する研究が必要なのが現状である。

40

【0008】

このような背景下で、本発明者らは、新たな幹細胞を開発するために多様な研究を行った結果、本発明の培養方法により製造された毛包由来幹細胞が体外増殖力、細胞性能、分化能に優れ、脱毛治療及び発毛促進用途として使用できることを確認し、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【0009】

50

本発明の一つの目的は、毛包組織及びハイドロゲルを用いて毛包由来幹細胞を培養する方法を提供することにある。

【0010】

本発明のもう一つの目的は、前記方法で製造された毛包由来幹細胞を提供することにある。

【0011】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛治療または発毛促進用薬学組成物を提供することにある。

【0012】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛改善または発毛促進用医薬部外品組成物を提供することにある。

【0013】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛改善または発毛促進用化粧品組成物を提供することにある。

【0014】

本発明の他の一つの目的は、毛包組織及びハイドロゲルを含む毛包由来幹細胞培養用組成物を提供することにある。

【0015】

本発明の他の一つの目的は、前記幹細胞培養用組成物を含む毛包由来幹細胞培養用キットを提供することにある。

【発明の効果】

【0016】

本発明の培養方法によると、毛包組織から効果的に幹細胞を分離及び得ることができ、前記得られた毛包由来幹細胞は、多分化能と自己複製能に優れ、脱毛治療及び発毛促進効果に優れるため、脱毛改善、予防または治療用途として有用に活用できる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】毛包組織の切片形成結果（a）、毛包組織のハイドロゲル取り込み培養模式図（b）、培養期間別のハイドロゲル内への細胞移動及び増殖結果（c）である。

【図2】HB－毛包由来幹細胞の免疫表現型を確認した結果である。

【図3】HB－毛包由来幹細胞の継代培養による増殖能を確認した結果である。

【図4】HB－毛包由来幹細胞のコロニー形成能を確認した結果である。

【図5a】HB－毛包由来幹細胞の脂肪細胞への分化能を確認した結果である。

【図5b】HB－毛包由来幹細胞の骨細胞への分化能を確認した結果である。

【図6a】DB基盤の発毛機能に関連する遺伝子String Network分析結果及びHB－毛包由来幹細胞の特異発毛促進機能性遺伝子を確認した結果である。

【図6b】HB－毛包由来幹細胞の主な発毛機能に関連する遺伝子の発現量を比較分析した結果である。

【図6c】HB－毛包由来幹細胞の特異的発現発毛促進機能性遺伝子を脂肪由来幹細胞に比した発現量を比較分析した結果である。

【図6d】HB－毛包由来幹細胞の特異的発現発毛促進機能性遺伝子を脂肪由来幹細胞に比した発現量を比較分析した結果である。

【図6e】HB－毛包由来幹細胞の特異的発現発毛促進機能性遺伝子を既存の毛包由来幹細胞に比した発現量を比較分析した結果である。

【図7a】マウスモデルにおいてHB－毛包由来幹細胞の発毛促進効果を確認した結果である。

【図7b】マウスモデルにおいてHB－毛包由来幹細胞の発毛促進効果を確認した結果で

10

20

30

40

50

ある。

【図 8 a】マウスモデルにおいて H B - 毛包由来幹細胞の毛包形成能を確認した結果である。

【図 8 b】マウスモデルにおいて H B - 毛包由来幹細胞の毛包形成能を確認した結果である。

【図 8 c】マウスモデルにおいて H B - 毛包由来幹細胞の毛包形成能を確認した結果である。

【図 8 d】マウスモデルにおいて H B - 毛包由来幹細胞の毛包形成能を確認した結果である。

【図 9 a】マウスモデルにおいて H B - 毛包由来幹細胞の W n t s i g n a l i n g 作用機序を確認した結果である。

【図 9 b】マウスモデルにおいて H B - 毛包由来幹細胞の W n t s i g n a l i n g 作用機序を確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

これを具体的に説明すると、次の通りである。一方、本発明で開示されたそれぞれの説明及び実施形態は、それぞれの異なる説明及び実施形態にも適用することができる。即ち、本発明で開示された多様な要素の全ての組合せが本発明の範疇に属する。また、下記の具体的な記述により本発明の範疇が制限されるとは見られない。

【0019】

前記目的を達成するための本発明の一態様は、毛包組織及びハイドロゲルを用いた毛包由来幹細胞の培養方法及び前記方法で培養された毛包由来幹細胞を提供する。

【0020】

具体的には、毛包組織由来幹細胞の培養方法は、(a) 毛包組織をハイドロゲル内に取り込んで培養して培養物を得る段階；及び (b) 前記で得られた培養物においてハイドロゲルを分解して前記毛包組織からハイドロゲル内に移動及び増殖した幹細胞を回収する段階を含む。

【0021】

本発明において、前記ハイドロゲルは、親水性高分子が共有または非共有結合で架橋されて作られた 3 次元網状構造物を意味するものであり、毛包組織をハイドロゲル内に 3 次元的に取り込むことにより、ハイドロゲルは毛包組織の物理的支持を提供すると共に毛包組織内に存在する毛包由来幹細胞をハイドロゲル内に移動し、増殖できる細胞外基質機能を同時に提供することができる。

【0022】

また、本発明のハイドロゲルは、ハイドロゲル支持 3 次元培養のために溶液状態で存在し、ゾルとゲルに変換できる相転移 (p h a s e t r a n s i t i o n a l) 性ハイドロゲルが好ましく、具体的には、コラーゲン (c o l l a g e n) 、ゼラチン (g e l a t i n) 、コンドロイチン (c h o n d r o i t i n) 、ヒアルロン酸 (h y a l u r o n i c a c i d) 、アルギニン (a l g i n i c a c i d) 、マトリゲル (M a t r i g e l T M) 、キトサン (c h i t o s a n) 、ペプチド (p e p t i d e) 、フィブリン (f i b r i n) 、PGA (p o l y g l y c o l i c a c i d) 、PLA (p o l y l a c t i c a c i d) 及び PEG (p o l y e t h y l e n e g l y c o l) 、ポリアクリルアミド (p o l y a c r y l a m i d e) からなる群から選択されたいずれか一つ以上であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0023】

前記 (a) 段階において、毛包組織が取り込んだハイドロゲルの培養は、当業界において幹細胞の培養に適することが知られている通常の培地に毛包組織が取り込まれたハイドロゲルを浸漬した後に行われてもよい。

【0024】

また、前記 (a) 段階は、毛包組織をハイドロゲル多重層の間に取り込んで培養するも

10

20

30

40

50

のもであってもよい。具体的には、ハイドロゲル二重層の間に毛包組織を取り込んで培養するものであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0025】

本発明の一実施例では、毛包組織をハイドロゲルに取り込み時に２段階に分けてハイドロゲルを添加し、サンドイッチ型ハイドロゲル二重層の間に毛包組織が取り込まれるように培養した。

【0026】

前記のように、ハイドロゲル多重層の間に毛包組織を取り込む場合、毛包組織の切片に残っているhairのキューティクルの表層の疎水性により組織切片が水和されずに浮遊することを防止することができ、前記２段階ハイドロゲル処理をしてハイドロゲル二重層の間に毛包組織が十分にハイドロゲルに取り込みできるという長所がある。

10

【0027】

また、前記（a）段階において、前記毛包組織は、表皮（epidermal）から毛包漏斗部（follicular infundibulum）に該当する部位を除去した切片を用いることであってもよい。前記切片は、0.01～10mm、0.05～5mm、0.1～3mmであってもよいが、前記切片のサイズが制限されるものではない。

【0028】

本発明の一実施例では、毛包組織切片の形成時に表皮（epidermal）領域の漏斗部（infundibulum）に該当する部位を除去した1～3mmの毛包組織切片を用いて培養に用いた。

20

【0029】

また、前記（a）段階において、毛包組織の培養期間は、3日～20日、3日～18日、3日～16日、3日～14日または4日～12日間であってもよいが、これに制限されるものではない。

【0030】

前記培養期間が増加するほど組織重量当たり分離した細胞数が増加するため、細胞の分離効率の側面では有利であるが、培養を持続するほど組織周辺のハイドロゲル内のcell confluencyが増加してcontact inhibitionによる細胞増殖の抑制、幹細胞分化誘導の可能性があり、Cell/Hydrogelの比率が増加、cell aggregationが発生することにより、細胞分離時にhydrogel選択的な分解によるcell releaseが阻害される。

30

したがって、組織周辺で細胞過密による凝集（aggregation）及び組織周辺の混濁が観察されるため、組織培養時の適切な培養期間は、細胞outgrowthと観察される期間内に適切に調節することが重要である。

【0031】

本発明の一実施例では、毛包組織を4日～12日間培養して使用した。

【0032】

また、前記（a）段階において毛包組織の培養は、組織間の間隔が1mm以上、2mm以上、3mm以上、4mm以上、5mm以上、50mm以下、40mm以下、30mm以下、20mm以下、または10mm以下で播種することができるが、これに制限されるものではない。

40

【0033】

前記培養時の組織播種において組織間の間隔は、Outgrown distanceを考慮して組織一つから移動／増殖した細胞の距離を考慮して播種が必要である。

【0034】

本発明の一実施例では、組織切片播種時の組織間の間隔は5mm以上で播種して培養した。

【0035】

前記（b）段階は、（a）段階のハイドロゲル支持３次元培養段階後、ハイドロゲル内に移動／増殖した毛包由来幹細胞を回収するために、ハイドロゲルのみを選択的に分解

50

させることができる。

【0036】

前記ハイドロゲルの分解は、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、TPA (tissue plasminogen activator)、プラスミン (plasmin) 及びヒアルロニダーゼからなる群から選択された一つ以上の酵素を通じて分解することができる。

【0037】

本発明の毛包幹細胞の分離／培養技術は、ハイドロゲル基盤のニッチ保存自己複製誘導分離技術で幹細胞を分離する技術であり、毛包組織が体外生存／培養され、酵素処理なしに組織から直接純度の高い細胞を分離できる新技術に該当する。

10

【0038】

既存の方法とは異なり、本分離方法は、現存する方式と差別化した方式で体外増殖力及び細胞性能の側面で優れるという長所がある。

【0039】

既存の方法で分離した細胞は、2－3継代（最大5継代）までのみ体外増幅が可能であるが、本発明の方法で分離した細胞は、8継代以上継代培養しても細胞老化が起きないなど性能が優れ、長期間の継代培養が可能であるため、大量生産が可能である。

【0040】

一方、本発明で提供する毛包由来幹細胞を製造する方法により製造された毛包由来幹細胞は、その細胞の表面にCD73、CD90、CD105、NestinまたはLgr5が発現し、CD34、CD45またはHLA-DRは発現しない免疫学的特性を示し、脂肪細胞または骨細胞などに分化できる多分化特性を示すが、これに制限されるものではない。

20

【0041】

前記毛包由来幹細胞は、本発明で提供する毛包由来幹細胞を製造する方法により製造された毛包由来幹細胞、本発明の毛包由来幹細胞、毛包由来幹細胞、HB－毛包由来幹細胞、本発明のHB－毛包由来幹細胞、HB－HFSCと混用され得る。

【0042】

本発明の一実施例では、本発明の毛包由来幹細胞の製造方法により製造した毛包由来幹細胞の増殖能、分化能、コロニー形成能を確認することができた。

30

【0043】

本発明のまた他の実施例では、本発明の毛包由来幹細胞の製造方法により製造した毛包由来幹細胞の発毛促進効果を確認することができた。

【0044】

本発明のまた他の実施例では、さらに、継代培養による細胞成長能／細胞老化（体外増殖力）及び初代細胞の純度評価の遂行を通じて体外で生存期間が長く、生存能が優れていることを確認することができた。

【0045】

本発明で提供する毛包由来幹細胞を製造する方法により製造された毛包由来幹細胞は、特異的発毛促進機能性遺伝子を発現することができる。

40

【0046】

その時、前記発毛促進機能性遺伝子は、具体的には、SANP25 (Synaptosome Associated Protein 25)、COL10A1 (Collagen Type X Alpha 1 Chain)、TMEM119 (Transmembrane Protein 119)、AQP1 (Aquaporin 1)、PLCB4 (1-Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4) 及びITGA8 (Integrin Subunit Alpha 8) から選択されるいずれか一つ以上の遺伝子であってもよいが、これに制限されるのではなく、発毛促進機能性遺伝子として知られた遺伝子であれば、これに含まれ得る。

50

【0047】

本発明の一実施例では、前記毛包由来幹細胞の製造方法により製造された毛包由来幹細胞において脂肪由来幹細胞に比べて前記7個の発毛促進機能性遺伝子が10倍以上の顕著な発現量を示すことを確認し、本願方法により製造された毛包由来幹細胞が特異的発毛促進機能性遺伝子を発揮することを確認することができた。

【0048】

本発明の他の一態様は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛治療または発毛促進用薬学組成物を提供する。

【0049】

本発明の用語、「培養物」または「培養液」は、毛包由来幹細胞を培地で培養する過程中または培養した後に得られた培養物またはその上澄液、その濃縮物またはその凍結乾燥物であってもよい。

【0050】

本発明の用語、「発毛」または「発毛促進」は、毛髪の成長促進、毛髪本数の増加、毛髪の太さが太くなる効果だけでなく、毛包再生または毛包細胞の増殖を含む概念であり、前記毛包細胞の増殖は、毛包細胞が休止期から増殖期への変換が促進されることを含むことができるが、これに制限されるものではない。

【0051】

本発明の用語、「薬学組成物」とは、疾病の予防または治療を目的として製造されたものを意味し、実際の臨床投与時に経口及び非経口の種々の剤形で投与されてもよいが、製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を用いて調剤することができる。

【0052】

また、それぞれの剤形に応じて薬学的に許容可能な添加剤をさらに含むことができ、その時、薬学的に許容可能な添加剤としては、デンプン、ゼラチン化デンプン、微結晶セルロース、乳糖、ポビドン、コロイダルシリコーンジオキシド、リン酸水素カルシウム、ラクトース、マンニトール、飴、アラビアゴム、前糊化デンプン、コーンスターチ、粉末セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、オパドライ、デンプングリコール酸ナトリウム、カルナウバロウ、合成ケイ酸アルミニウム、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸アルミニウム、ステアリン酸カルシウム、白糖、デキストロース、ソルビトール及びタルクなどが用いられる。本発明による薬学的に許容可能な添加剤は、前記組成物に対して0.1～90重量部が含まれ得る。

【0053】

前記薬学組成物には、前記毛包由来間葉系幹細胞以外にも一つまたはそれ以上の薬学的に許容可能な通常の不活性担体、例えば、注射剤の場合には保存剤、無痛化剤、可溶化剤または安定化剤などを、局所投与用製剤の場合には基剤（base）、賦形剤、潤滑剤または保存剤などをさらに含むことができる。

【0054】

本発明の薬学組成物は、個別治療剤で投与しても、他の治療剤と併用して投与してもよく、従来の治療剤とは順次または同時に投与することができる。そして、単一または多重投与することができる。前記要素を全て考慮し、副作用を誘発せず最小限の量で最大の効果が得られる量を投与することが重要であり、当業者により容易に決定することができる。

【0055】

それだけでなく、本発明で提供する薬学組成物は、前記毛包由来幹細胞以外にも脱毛の治療または発毛の促進を補助したり、前記毛包由来幹細胞の活性を維持したり、前記毛包由来幹細胞の分化を促進する多様な成分をさらに含むことができるが、一例として、抗炎症剤、幹細胞動員因子、成長誘導因子などをさらに含むことができる。

【0056】

本発明の薬学組成物は、脱毛の改善、予防または治療の目的で使用する事ができる。

【0057】

本発明の脱毛には一時的な脱毛である非瘢痕性脱毛と毛包や毛根が永久的に破壊されて現れる瘢痕性脱毛をいずれも含み、非瘢痕性脱毛には感染性脱毛、外傷性脱毛、炎症性脱毛、先天性脱毛、内分泌性脱毛、腫瘍性脱毛、栄養不足性脱毛、薬物による脱毛、そして毛髪の構造異常による脱毛を含み、男性型脱毛、女性型脱毛、円形脱毛も含む。

【0058】

本発明で使用される用語、「改善」とは、本発明による組成物を個体に投与して脱毛の進行を遅延又は脱毛の症状を軽減させるあらゆる行為を意味する。

【0059】

本発明で使用される用語、「予防」とは、本発明による組成物を個体に投与して脱毛の発生を抑制又は遅延させるあらゆる行為を意味する。

【0060】

本発明で使用される用語、「治療」とは、本発明の前記組成物を脱毛発生の疑いのある個体に投与して脱毛症状を好転又は有益にするあらゆる行為を意味する。

【0061】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組成物を個体に投与する段階を含む、発毛促進または脱毛の予防または治療方法を提供する。

【0062】

前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞、発毛促進、脱毛、予防、治療は、前述した通りである。

【0063】

本発明で使用される用語、「投与」とは、適切な方法で個体に前記組成物を導入することを意味する。具体的には、本発明の前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記皮膚由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組成物、またはそれを含む前記薬学的組成物を局所部位、例えば、脱毛部位に塗布または注射剤として投与することができるが、これに制限されるものではない。

【0064】

また、前記組成物は、発毛促進または脱毛の予防または治療に用いられる他の薬学的組成物と併用されてもよい。

【0065】

本発明の用語、「個体」とは、脱毛が発症又は発症し得るヒトを含むマウス、ラット、家畜などのあらゆる動物を意味する。前記動物は、ヒトだけでなく、これと類似の症状の予防または治療を必要とするウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ラクダ、カモシカ、イヌ、ネコなどの哺乳動物であってもよいが、これに制限されない。

【0066】

本発明の組成物は、薬学的に有効な量で投与することができる。

【0067】

前記用語、「薬学的に有効な量」とは、医学的治療に適用可能な合理的な受益／リスクの比率で疾患を治療するのに十分な量を意味し、有効用量の水準は、個体の種類及び重症度、年齢、性別、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出比率、治療期間、同時に使用される薬物を含む要素及びその他の医学分野においてよく知られている要素により決定することができる。

【0068】

前記組成物は、個別治療剤として投与したり他の治療剤と併用して投与することができる、従来の治療剤とは順次または同時に投与することができる。また、単一または多重投与することができる。前記要素を全て考慮し、副作用なしに最小限の量で最大の効果を得ることができる量を投与することが重要であり、これは、当業者により容易に決定することができる。

10

20

30

40

50

【0069】

また、前記組成物は、目的とする方法により経口投与しても非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用）してもよく、投与量は、患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び時間に応じて異なるが、当業者により適切に選択することができる。具体的な例として、前記組成物は、一般に、1日1回～数回に分けて投与することができるが、好ましい投与量は、個体の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び期間に応じて当業者により適切に選択することができる。

【0070】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛改善または発毛促進用医薬部外品組成物を提供することにある。

10

【0071】

本発明の用語、「医薬部外品組成物」とは、ヒトや動物の疾病を治療、軽減、処置または予防する目的として使用される繊維、ゴム製品またはそれと類似したもの、人体に対する作用が弱かったり人体に直接作用せず、器具または機械ではないものとそれと類似したもの、感染予防のために、殺菌、殺虫及びそれと類似した用途で 사용되는製剤の一つに該当する物品であり、ヒトや動物の疾病を診断、治療、軽減、処置または予防する目的で使用する物品中、器具、機械または装置ではないもの及びヒトや動物の構造と機能に薬理学的影響を与える目的として使用する物品中、器具、機械または装置ではないものを除いた物品を意味し、具体的には、皮膚外用剤または個人衛生用品であってもよい。

20

【0072】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む、脱毛改善または発毛促進用化粧品組成物を提供することにある。

【0073】

本発明の用語、「化粧品組成物」は、通常製造される如何なる剤形にも製造することができ、例えば、溶液、乳濁液、懸濁液、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、パウダー、スプレー、界面活性剤含有クレンジング、オイル、石鹸、液体洗剤、入浴剤、ファンデーション、メイクアップベース、エッセンス、化粧水、フォーム、パック、柔軟水、サンスクリーンクリームまたはサンオイルなどに剤形化することができる。

30

【0074】

本発明の他の一つの目的は、毛包組織及びハイドロゲルを含む毛包由来幹細胞培養用組成物及び前記組成物を含む毛包由来幹細胞培養用キットを提供することにある。

【0075】

併せて、毛包由来幹細胞培養用キットは、前記幹細胞培養用組成物と前記幹細胞の培養に必要な溶液、装置などの多様な構成要素を含むことができる。

【0076】

本発明の他の一つの目的は、前記毛包由来幹細胞、その培養物または前記毛包由来幹細胞から分化した細胞を有効成分として含む組成物の発毛促進または脱毛予防または治療用途を提供する。

40

【0077】

以下、本発明を実施例を通じてより詳細に説明する。しかし、これら実施例は、本発明を例示的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれら実施例に限定されるものではない。

【0078】

実施例 1. 多層ハイドロゲル支持毛包組織の3次元培養

供与された生理食塩水に浸漬して冷蔵保管された毛包組織を試料としてPBS (Gibco) で三回洗浄した。洗浄した毛包組織のhair shaft部分を切断した後、切断された側から0.5mm～1mmのinfundibulum部分を除去して毛包組織切片を形成した。DMEM (low glucose, Gibco) で1回洗浄した後、

50

上澄液を除去し、fibrinogen solution (0.25% w/v fibrinogen (緑十字)、200 μ g/mL tranexamic acid (シンブン製薬) in DMEM) 5mLを入れた。Thrombin solution (0.5 IU/mL thrombin (緑十字) in DMEM) を同量添加した100mmの培養容器に移して毛包切片及びハイドロゲルが均一に広がるようにした後、常温に10分以内で放置して毛包組織をハイドロゲルに固定させた。さらに、fibrinogen solution (0.25% w/v fibrinogen、200 μ g/mL tranexamic acid in DMEM) とThrombin solution (0.5 IU/mL thrombin in DMEM) を各5mLずつ添加し、10分以内で放置して2次ハイドロゲルを形成した後、37 $^{\circ}$ Cで2時間培養して十分にゲル化させた (図1b)。Tranexamic acid 100 μ g/mLが添加された成長培地10mL (90% low DMEM:F12=1:1, 10% Fetal bovine serum、20ng/mL epidermal growth factor、5ng/mL basic fibroblast growth factor、10ng/mL insulin-like growth factor, and 10 mg/mL gentamicin) を入れて10~30rpmの速度で攪拌しながら1時間培養した。その後、2~3日に一回ずつ成長培地を交換した。

10

【0079】

実施例2. 多層ハイドロゲル内に移動成長したHB-毛包由来幹細胞の回収及び増幅培養

実施例1で記述した方法で10日または14日間毛包組織を培養した。ハイドロゲルをwarm PBSで3分間三回洗浄した後、30% FBS/DMEMを入れてorbital shakerで10~30rpmの速度で攪拌した。1時間後に上澄液を除去した後、1 μ g/mL alteplaseが添加された10mL 30% FBS/DMEMを入れてgelを分解させた。Gelが十分に分解されると、static conditionでovernight培養した後、上澄液を除去し、成長培地を添加して常法で培養した。2~3日ごとに成長培地を交換しながら4~6日ごとに継代培養した。

20

【0080】

前記方法により培養した組織培養結果及び細胞分離及び培養結果は、図1に示した。

【0081】

実施例3. 分離及び培養されたHB-毛包由来幹細胞の免疫表現型の確認

30

実施例2の方法により分離及び培養されたHB-毛包由来幹細胞の免疫表現型を確認するために、T75フラスコで培養中であった細胞を得て3% bovine serum albumin (sigma)/PBSに懸濁した。細胞懸濁液は、9等分して次の抗体と4 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた：FITC-conjugated CD73 (Abcam、1:25) antibody, APC-conjugated CD90 (Invitrogen、1:40)、FITC-conjugated CD105 (Abcam、1:50)、FITC-conjugated CD34 (Abcam、1:10) antibody, FITC-conjugated HLA-DR (Novusbiologicals、1:20) antibody, Nestin (Novusbiologicals、1:100) antibody, FITC-conjugated Lgr5 (Origene、1:100) antibody, FITC-conjugated mouse IgG Isotype control (Novusbiologicals、1:5)。抗体、またはAlexaFluor594-conjugated CD45 (Novus、1:20) antibody. 反応後、300g、5minで遠心分離して洗浄した後、3% BSA/PBSに懸濁した後、フローサイトメトリー (BD) で測定した (図2)。

40

【0082】

その結果、図2で見られるように、分離及び培養されたHB-毛包由来幹細胞はCD73、CD90、CD105、Nestin及びLgr5が発現し、CD34、CD45及びHLA-DRは発現しないことを確認することができた。

50

【0083】

実施例4．分離及び培養されたHB－毛包由来幹細胞の増殖能及びコロニー形成能の確認

実施例2で得られた分離及び培養されたHB－毛包由来幹細胞の増殖能を確認するために、最初培養時に4000個/cm²の密度で細胞を播種し、4日ごとに継代し、得られた細胞数を通じて継代培養回数による群集の倍加時間を測定した。

【0084】

また、細胞数は、trypan blue染色法で染色されていない細胞の個数をカウントし、群集の倍加時間(PDTs, population doubling time)は、次の式から計算して図3に示した： $PDT = [days / (\log N_2 - \log N_1)] / \log 2$, ($N_1 = 4,000$ cells, $N_2 = 4$ 日後の細胞数)。

10

【0085】

また、実施例2で得られた分離及び培養されたHB－毛包由来幹細胞のコロニー形成能を確認するために、ヒト毛包由来幹細胞(4 passages)を6-well plateに20個/wellで播種した。3日ごとに成長培地で交換しながら14日間培養した。PBSで洗浄した後、4% paraformaldehyde/PBS (sigma)で15分間常温で放置して固定した。固定された細胞はPBSで三回洗浄した後、0.5% crystal violet/Methanolで15分間常温で放置して染色させた。残余溶液を全部除去した後、蒸留水で三回洗浄し、染色されたコロニーを観察した結果を図4に示した。

【0086】

20

前記図3及び4の結果のように、本実施例2の方法により得られたHB－毛包由来幹細胞は継代培養による増殖能が維持され、コロニー形成能も、一定レベル以上であることを確認することができた。

【0087】

即ち、毛包由来幹細胞を継代培養6回目まで培養してpopulation doubling time(PDT)を求めた結果、PDTは平均32時間±7時間と観察され、継代培養による増殖能が維持されることを確認することができた。

【0088】

実施例5．HB－毛包由来幹細胞の分化能の確認

得られたHB－毛包由来幹細胞の脂肪細胞への分化能力を評価するために、細胞を 1×10^4 個/cm²の濃度で播種し、80% confluencyに到達するまで成長培地で培養した後、StemPro™ Adipogenesis differentiation kit(Gibco, cat. A1007001)で培地を交換し、3日ごとに培地を交換しながら14日間培養した。4% PFAで15分間固定し、60% isopropanolで15分間反応させた後、全ての溶液を除去して十分に乾燥させた。60% Oil Red O(sigma)/ethanolを常温で15分間染色して細胞質内における脂肪蓄積の有無を確認した(図5a)。

30

【0089】

また、前記HB－毛包由来幹細胞の骨細胞への分化能力を評価するために、細胞を 1×10^4 個/cm²の濃度で播種し、80% confluencyに到達するまで成長培地で培養した後、StemPro™ Osteogenesis differentiation kit(Gibco, cat. A1007201)で培地を交換し、3日ごとに培地を交換しながら14日間培養した。4% PFAで60秒間固定し、BCIP/NBT substrate solution(Sigma)処理後、遮光条件で10分間染色して塩基性リン酸分解酵素(Alkaline phosphatase, ALP)の活性を確認した(図5b)。

40

【0090】

即ち、前記のような結果として本願培養方法により得られたHB－毛包由来幹細胞は、多分化能を有していることを確認することができた。

【0091】

50

実施例 6. HB-毛包由来幹細胞の脂肪由来幹細胞に比した差異発現遺伝子の確認

脂肪由来幹細胞 (ASC-1, ASC-2, ASC-3)、HB-毛包由来幹細胞 (HB-HFSC-1, HB-HFSC-2, HB-HFSC-3) を各 3 lot のサンプルを TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit を用いてメーカーのプロトコルによりペアエンド RNA ライブラリーを構築し、マクロジェン社 (ソウル、大韓民国) でシーケンシングを行った。前処理過程後、HISAT2 プログラム (バージョン 2.1.0, <https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) でリファレンスゲノム (バージョン GRCh38) にマッピングし、StringTie プログラム (バージョン 2.1.3b, <https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>) で転写体別の発現量プロファイルを得た (図 6a)。遺伝子発現量は、TPM (Transcripts Per Kiobase Million) 値にログを取って扱った (図 6a)。対照群と比較群間の差異発現遺伝子は、R プログラム (バージョン 4.0) の edgeR パッケージ [1] を用いて得た (1. SZKLARCZYK, Damian, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 2019, 47. D1: D607-D613.)。幹細胞で差異発現する遺伝子の発現パターンを関連疾患転写体データと比較のために、公開された転写体データを GEO (Gene Expression Omnibus) データベースで収集した。各公開データの差異遺伝子発現量分析は、R プログラム (バージョン 4.0) の limma パッケージ [2] を用いた (2. ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics*, 2010, 26. 1: 139-140.)。分析プログラムにより自主的に提供する統計的検定結果はそのまま使用し、有意な水準は 0.05 未満を有意なことと見なした。P value が 0.05 超の結果を表記する場合、P value を別途に表記した。

【0092】

マーカー遺伝子が参加する生物学的ネットワーク構築は、String Database (バージョン 11.5) [3] を用いて (3. SMYTH, Gordon K., et al. LIMMA: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. Statistics for Biology and Health. 2005.) タンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) ネットワークを構築した (図 7a、b)。PPI ネットワーク構築に使用した有機体レファレンスは *Homo sapiens* とした。ネットワーク構築のための設定でタンパク質を示すノード (node) を互いに連結するエッジ (edge) は、実験の結果、生物学的データベース及び文献、遺伝子フュージョンなどの根拠基盤で連結するようにし、エッジ点数は 0.4 以上であることを有意なこととした。ネットワーク構築後、他のノード間の連結性がない孤児ノードは除去した。ノードグループが属する生物学的機能は、KEGG データベース [4] を基準として統計的に有意なことのみに抽出した (False Discovery Rate < 0.05) (4. KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 2000, 28. 1: 27-30.)。両グループ間の有意な差の検定は T-Test を行って得、P value < 0.05 未満を有意なことと見なした。分析プログラムにより自主的に提供する統計的検定結果はそ

のまま使用し、有意な水準は0.05未満を有意なことと見なした。P valueが0.05超の結果を表記する場合、P valueを別途に表記した。

【0093】

String DBを用いてHB-毛包由来幹細胞で発現した遺伝子を発毛促進関連遺伝子networkと分析し、既知の発毛促進pathwayとの関連性を確認し、7個の発毛促進機能性遺伝子(SNAP25, ITGA8, PLCB4, COL10A1, GPNMB, TMEM119, AQP1)を導出した(図6a)。また、HB-毛包由来幹細胞が脂肪由来幹細胞に比べて主要発毛機能に関連する遺伝子(TCF3, PRDM1, WNT5A, WNT5B, WNT9A, FGFR2など)を高い水準で発現することを確認した(図6b)。HB-毛包由来幹細胞においてFold change>10で脂肪由来幹細胞に比べて発現した遺伝子80個を確認し、そのうち、図6aで導出した発毛促進機能性遺伝子7個(SNAP25, ITGA8, PLCB4, COL10A1, GPNMB, TMEM119, AQP1)が脂肪由来幹細胞に比べて差異発現が現れた(図6c及び6d)。既存の毛包または毛包由来幹細胞とHB-毛包由来幹細胞の遺伝子発現量を比較した時、発毛促進機能性遺伝子7個(SNAP25, ITGA8, PLCB4, COL10A1, GPNMB, TMEM119, AQP1)が10倍以上の発現が増加し、有意に差異発現されることを確認した(図6e)。

10

【0094】

前記発毛促進機能性遺伝子7種は、毛包形成と生長に関連して知られたシグナリングであるWnt signaling及びPI3K signalingと関連性のある遺伝子として知られているところ、これに基づいて本発明の毛包由来幹細胞製造方法により製造された毛包由来幹細胞の発毛促進効果を類推することができる。

20

【0095】

さらに、毛包の退行期を誘導する遺伝子として知られたCCN2、TGFB1遺伝子の場合、発現の減少を確認することができた(図6b)。

【0096】

実施例7. ヌードマウスにおける発毛促進効果の確認

実験動物である7~12週齢のBALB/c nude mouse(中央実験動物)を3% Isoflurane(ハナ製薬)を通じて吸入麻酔させた。麻酔が完了したことを確認した後、HB-毛包由来幹細胞 1×10^6 個の細胞をNormal saline(NS)100 μ lに懸濁して背側部(Dorsal part)に4ヶ所(2 $\times$ 2cm)の角にInsulin syringe(30 gauge)を用いて皮内注射(Intradermal injection)した。HB-毛包由来幹細胞投与後14日、31日間追跡観察し、投与直後(0日)、投与後3日、7日、14日、28日、31日にデジタルカメラで投与部位を撮影した。投与部位(2 $\times$ 2cm、4cm²)を百分率を基準として毛が生えた部分の広さをImage J(NIH)を通じて測定した(図7a及び図7b)。前記結果として本HB-毛包由来幹細胞の発毛促進効果を確認することができた。

30

【0097】

実施例8. ヌードマウスにおける毛包形成能及び皮膚の厚さ増加の確認

40

組織学的分析のために、皮膚組織を固定液(4% formaldehyde, sigma)に24時間固定した後、組織をパラフィン包埋(Paraffin embedding)して薄切りした後、H&E(Hematoxylin & Eosin)染色を行った。光学顕微鏡を通じて毛包及び皮膚層厚さの形態学的変化を確認した。形成された毛包数及びEpidermis、Dermis、Hypodermisの厚さはImage Jを通じて測定した(図8)。HB-毛包由来幹細胞投与14日及び31日後、毛包形成及び皮膚の厚さ増加を確認した。

【0098】

実施例9. ヌードマウスにおけるWnt信号伝達作用機序の確認

前記H&E染色と同様に、各群の組織を固定し、パラフィン包埋後に薄切りして組織ス

50

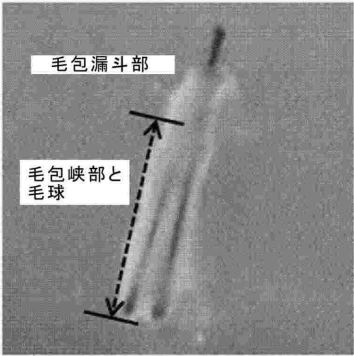
ライドを製作した。Beta-catenin antibody (Invitrogen, MA1-2001) に2次抗体を付けて組織免疫化学染色 (Immunofluorescence, IF) を進め (図9a)、プレハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド、4XSSC、50mM DDT、4XDenhart's soln, 'XTED、100ug/ml denatured salmon sperm DNA、250ug/ml yeast RNA) 42℃で1時間反応させてCD34 mRNAに結合するようにした (図9b)。HB-毛包由来幹細胞投与31日後β-catenin発現が増加し、CD34遺伝子発現が増加することを確認した。

【0099】

以上の説明から、本発明が属する技術分野の当業者であれば、本発明がその技術的思想や必須の特徴を変更することなく、他の具体的な形態で実施されうることが理解できるだろう。これに関連し、以上で記述した実施例はあくまで例示的なものであり、限定的なものでないことを理解すべきである。本発明の範囲は前記詳細な説明よりは、後述する請求の範囲の意味及び範囲、そしてその等価概念から導かれるあらゆる変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈すべきである。

【図面】

【図1a】



【図1b】



10

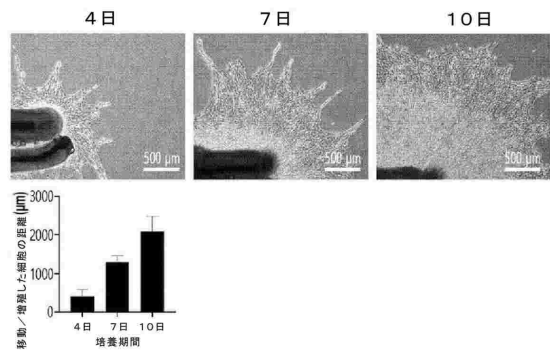
20

30

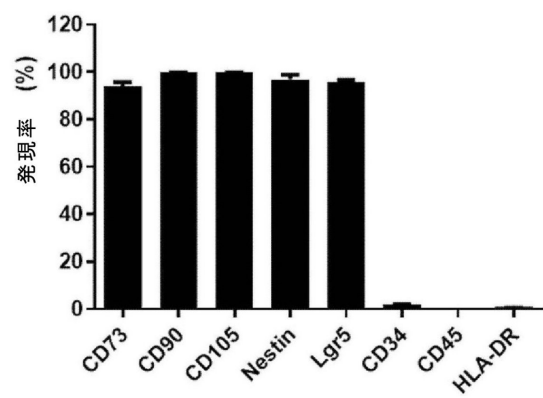
40

50

【図 1 c】

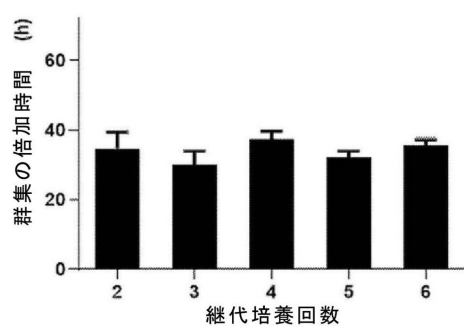


【図 2】

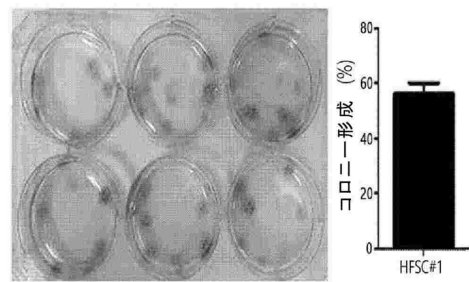


10

【図 3】



【図 4】



20

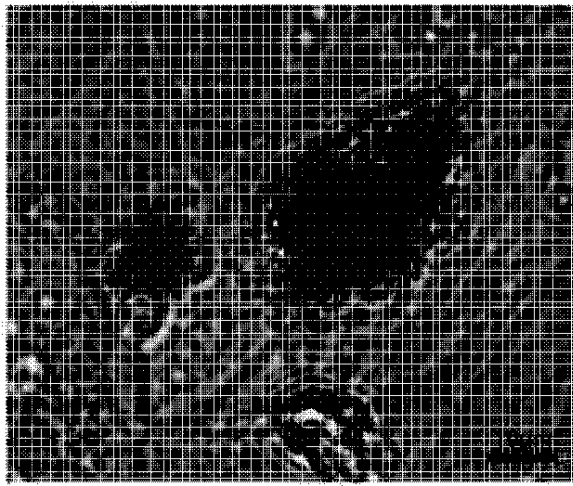
30

40

50

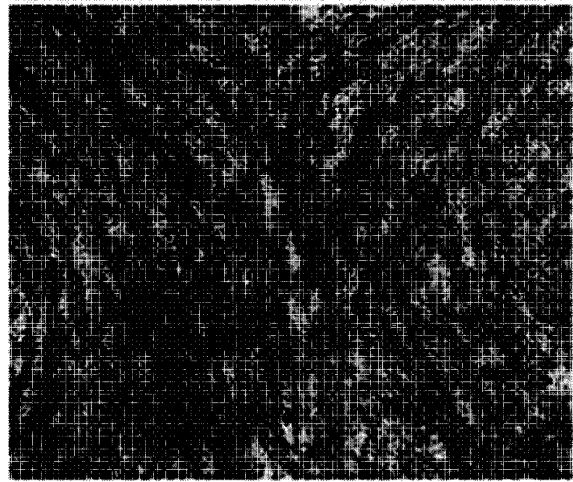
【図 5 a】

[5a]



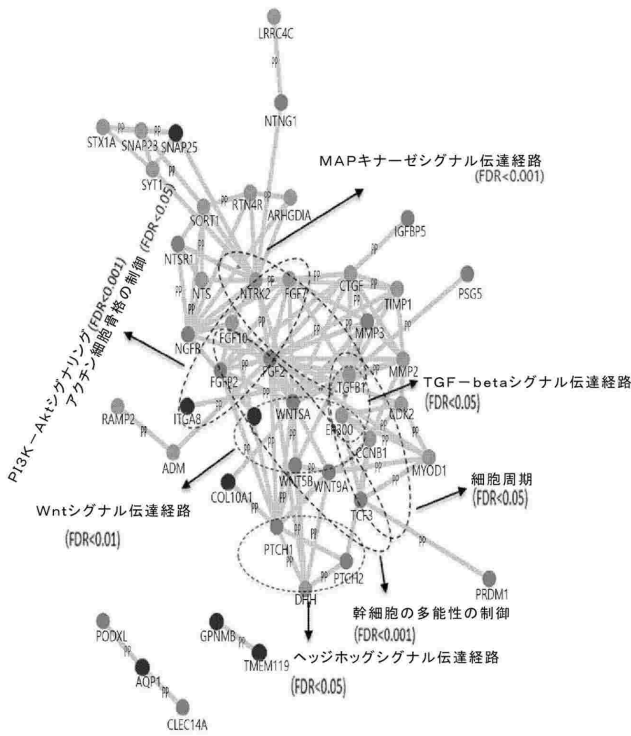
【図 5 b】

[5b]

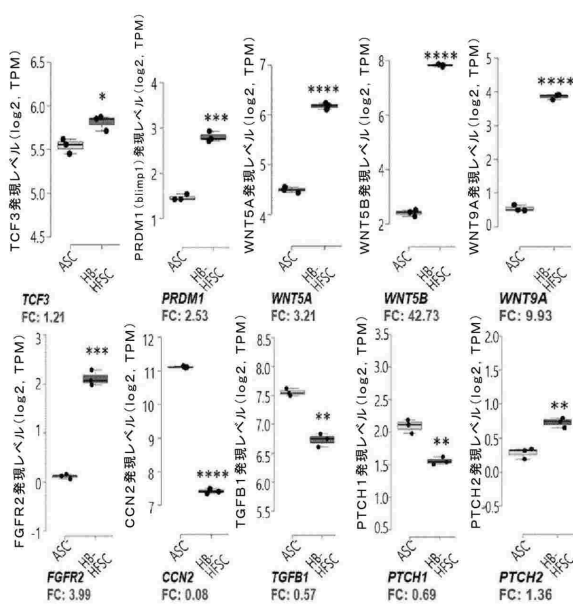


10

【図 6 a】



【図 6 b】



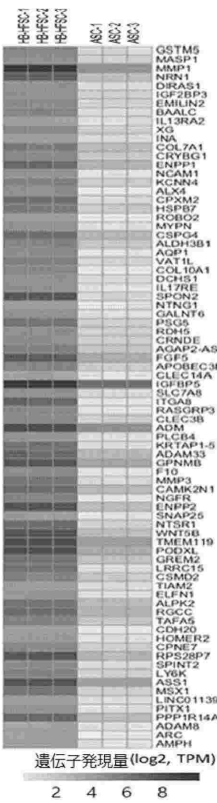
20

30

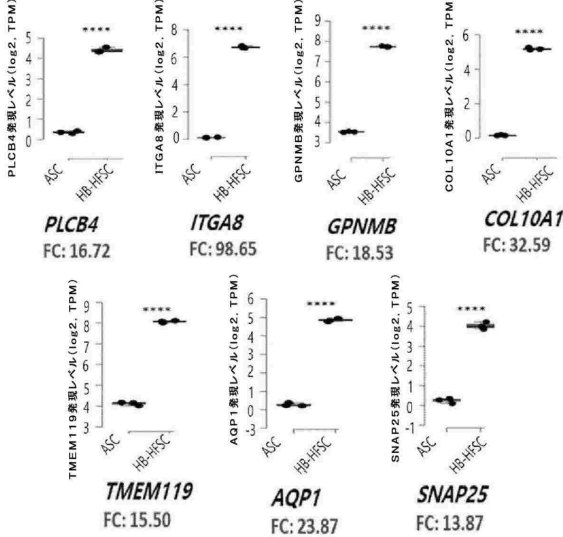
40

50

【図 6 c】



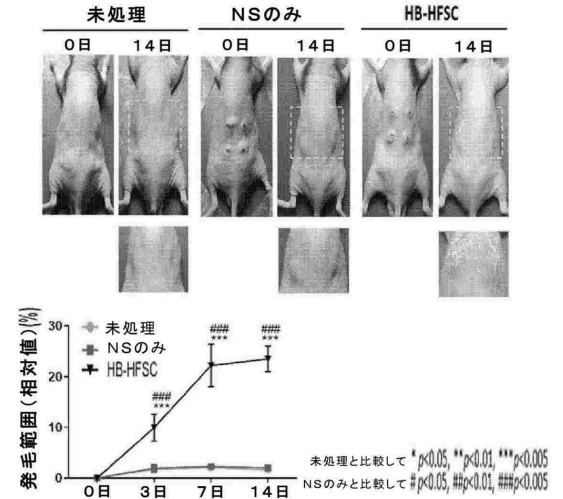
【図 6 d】



【図 6 e】

HB-HFSC 対 CD200陽性CD49陽性 HFSC		HB-HFSC 対 健康なHF組織	HB-HFSC 対 健康なHF組織
LRRC15		3.21	1.49
TMEM119	HB-HFSC 特異的	1.48	2.26
SNAP25		2.26	
CAMK2N1		2.04	
GPNMB	HB-HFSC 特異的	1.22	
KRTAP1-5		31.92	
PLCB4		2.46	
ITGA8	HB-HFSC 特異的		1.61
SLC7A8		2.49	3.86
AGAP2-AS1		1.12	
CRNDE			
GALNT6		1.86	1.93
IL17RE		1.33	
DCHS1		2.34	
COL10A1	HB-HFSC 特異的	1.83	3.24
VAT1L		4.61	
AQP1		1.46	

【図 7 a】



10

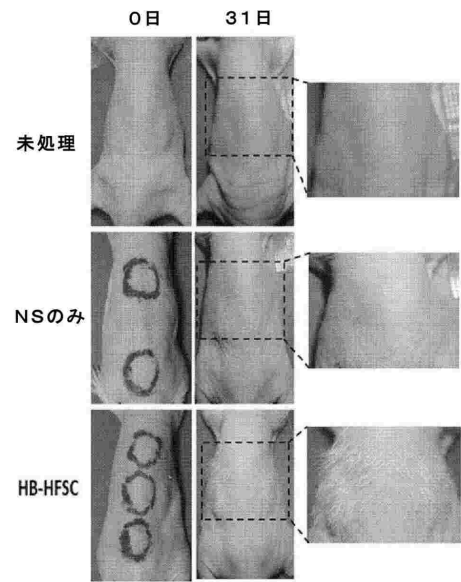
20

30

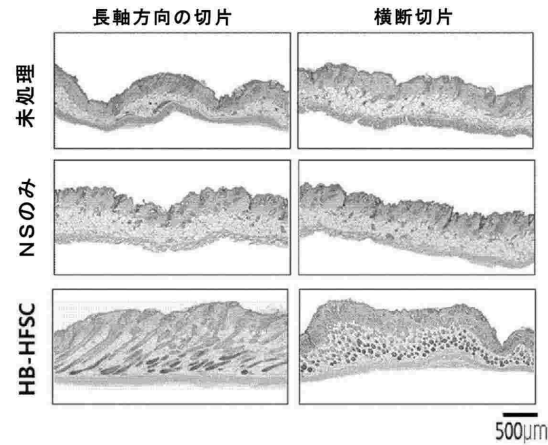
40

50

【図 7 b】

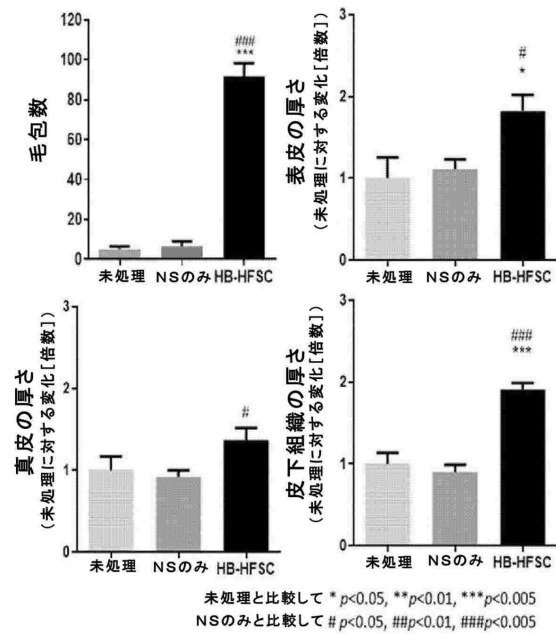


【図 8 a】

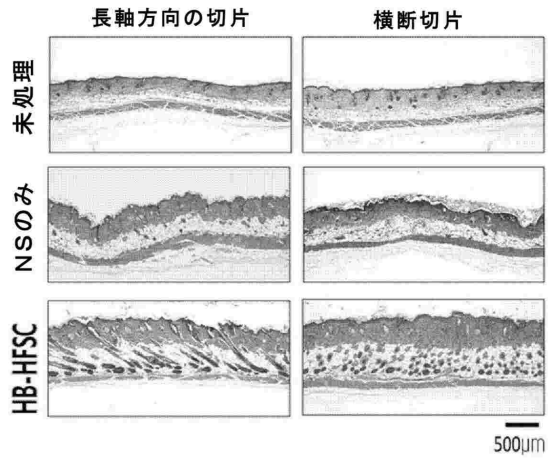


10

【図 8 b】



【図 8 c】



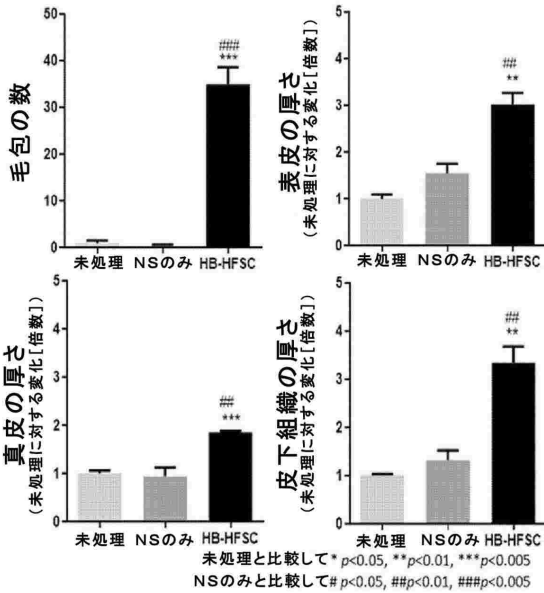
20

30

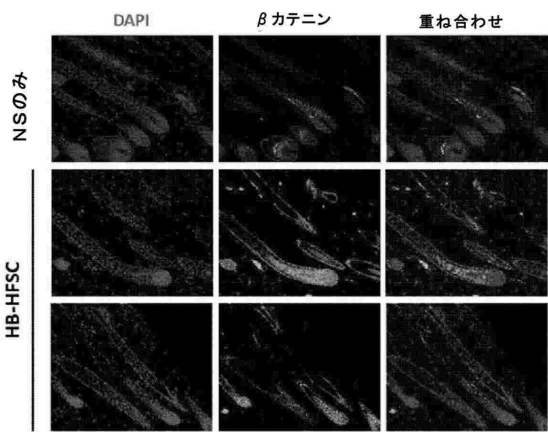
40

50

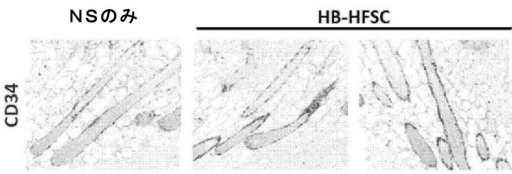
【図 8 d】



【図 9 a】



【図 9 b】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/021214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/071(2010.01)i; A61K 35/36(2006.01)i; A61P 17/14(2006.01)i; A61K 8/98(2006.01)i; A61Q 7/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/071(2010.01); A61K 31/506(2006.01); A61K 31/5377(2006.01); C12N 5/0775(2010.01); C12N 5/09(2010.01); C12N 5/095(2010.01); G01N 33/50(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 모낭 유래 줄기세포(hair follicle-derived stem cell), 하이드로겔(hydrogel), 세포 외기질(extracellular matrix, ECM), 모발 성장(hair growth), 탈모(hair loss)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018-0282690 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 04 October 2018 (2018-10-04) See paragraphs [0001]-[0109] and [0223]-[0416].	1-13
A	KR 10-2013-0124074 A (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 13 November 2013 (2013-11-13) See claim 1.	1-13
A	KR 10-2021-0054749 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 14 May 2021 (2021-05-14) See claim 1.	1-13
A	US 2020-0121681 A1 (FREQUENCY THERAPEUTICS, INC.) 23 April 2020 (2020-04-23) See entire document.	1-13
A	KR 10-2019-0112186 A (BHANG, Dongha) 02 October 2019 (2019-10-02) See entire document.	1-13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 April 2023		Date of mailing of the international search report 06 April 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/021214

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2018-0282690	A1	04 October 2018	EP	3359645	A1	15 August 2018
				WO	2017-060240	A1	13 April 2017
KR	10-2013-0124074	A	13 November 2013	KR	10-1389849	B1	29 April 2014
KR	10-2021-0054749	A	14 May 2021	None			
US	2020-0121681	A1	23 April 2020	WO	2020-081838	A1	23 April 2020
KR	10-2019-0112186	A	02 October 2019	EP	3768822	A1	27 January 2021
				EP	3768824	A1	27 January 2021
				KR	10-2019-0112185	A	02 October 2019
				KR	10-2019-0112186	A	02 October 2019
				KR	10-2021-0093382	A	27 July 2021
				KR	10-2373335	B1	11 March 2022
				KR	10-2445537	B1	21 September 2022
				US	2021-0095253	A1	01 April 2021
				US	2021-0095256	A1	01 April 2021
				WO	2019-182326	A1	26 September 2019
				WO	2019-182358	A1	26 September 2019

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/021214

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i; A61K 35/36(2006.01)i; A61P 17/14(2006.01)i; A61K 8/98(2006.01)i; A61Q 7/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류 기재) C12N 5/071(2010.01); A61K 31/506(2006.01); A61K 31/5377(2006.01); C12N 5/0775(2010.01); C12N 5/09(2010.01); C12N 5/095(2010.01); G01N 33/50(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 모낭 유래 줄기세포(hair follicle-derived stem cell), 하이드로겔(hydrogel), 세포외기질(extracellular matrix, ECM), 모발 성장(hair growth), 탈모(hair loss)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2018-0282690 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 2018.10.04 단락 [0001]-[0109], [0223]-[0416]	1-13
A	KR 10-2013-0124074 A (인제대학교 산학협력단 등) 2013.11.13 청구항 1	1-13
A	KR 10-2021-0054749 A ((주)아모레퍼시픽) 2021.05.14 청구항 1	1-13
A	US 2020-0121681 A1 (FREQUENCY THERAPEUTICS, INC.) 2020.04.23 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2019-0112186 A (방동하) 2019.10.02 전체 문헌	1-13
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "I" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년04월05일(05.04.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년04월06일(06.04.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 히주형 전화번호 +82-42-481-5373

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/021214

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0282690 A1	2018/10/04	EP 3359645 A1	2018/08/15
		WO 2017-060240 A1	2017/04/13
KR 10-2013-0124074 A	2013/11/13	KR 10-1389849 B1	2014/04/29
KR 10-2021-0054749 A	2021/05/14	없음	
US 2020-0121681 A1	2020/04/23	WO 2020-081838 A1	2020/04/23
KR 10-2019-0112186 A	2019/10/02	EP 3768822 A1	2021/01/27
		EP 3768824 A1	2021/01/27
		KR 10-2019-0112185 A	2019/10/02
		KR 10-2019-0112186 A	2019/10/02
		KR 10-2021-0093382 A	2021/07/27
		KR 10-2373335 B1	2022/03/11
		KR 10-2445537 B1	2022/09/21
		US 2021-0095253 A1	2021/04/01
		US 2021-0095256 A1	2021/04/01
		WO 2019-182326 A1	2019/09/26
		WO 2019-182358 A1	2019/09/26

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/36 (2015.01)	A 6 1 K 35/36	
MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU, CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY, MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW ーグ イファヨデーギル 5 2 ビー ドン 3 0 5 ホ		
(74)代理人	110000176 弁理士法人一色国際特許事務所	
(72)発明者	リ, ソン チン 大韓民国 0 7 3 3 3 ソウル ヨンドウンポーグ ククチェグムユンーロ 8 6 1 0 1-3 3 0 3	
(72)発明者	シン, チーヨン 大韓民国 3 2 8 0 0 チョンチュンナムード キエリョンーシ シンドアンーミョン キエリョンデ ーロ 6 6 3 2 0 1-3 0 1	
(72)発明者	チョン, チョン ファ 大韓民国 0 3 9 3 8 ソウル マポーグ ウォルド コプーロ 3 4-ギル 1 4 1 1 1 0 ホ	
(72)発明者	キム, ヒチョン 大韓民国 1 3 5 0 3 キョンギード ソンナムーシ プンダンーグ ポルマルーロ 3 0 ボンーギル 3 2 9 1 6-4 0 6	
F ターム (参考)	4B065 AA93X BC03 BC46 CA44 CA50 4C083 AA071 CC37 EE22 4C087 AA01 AA02 BB48 NA14 ZA89	