

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 3월 20일 (20.03.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/042401 A1

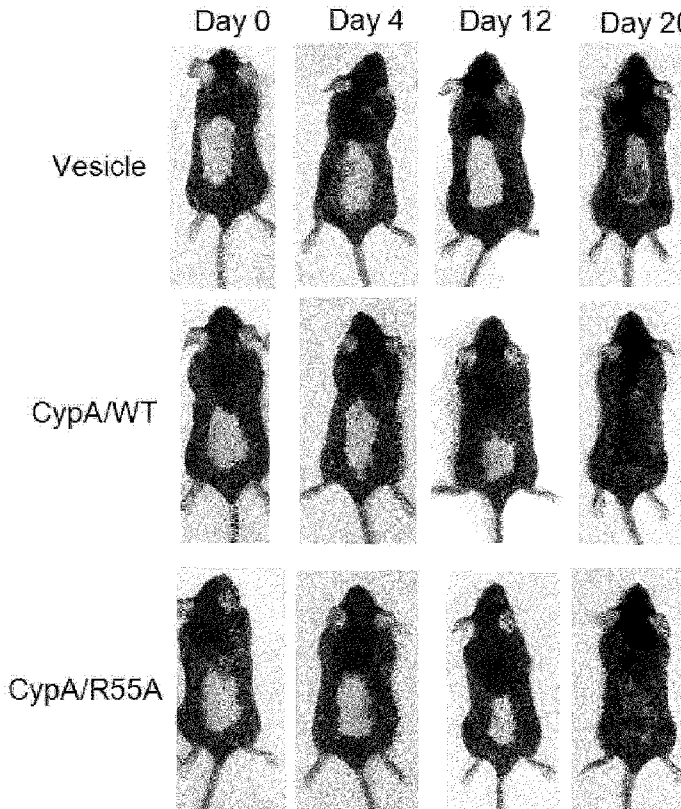
- (51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/008164
- (22) 국제출원일: 2013년 9월 10일 (10.09.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0101053 2012년 9월 12일 (12.09.2012) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 최원재 (CHOE, Wonchae); 140-050 서울시 용산구 삼개로 60, 101 동 202 호, Seoul (KR). 김기윤 (KIM, Kiyoan); 413-110 경기도 파주시 청암로 28, 810 동 402 호, Gyeonggi-do (KR). 조윤희 (JO, Yunhee); 151-801 서울시 관악구 승방길 65, 304 호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 유수미 (YU, Su Mi); 135-080 서울시 강남구 봉은사로 116, 5층 스카이특허법률사무소, 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, BN, 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING CYCLOPHILIN A FOR PREVENTING ALOPECIA OR IMPROVING HAIR RESTORATION

(54) 발명의 명칭 : 사이클로필린 A를 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising a cyclophilin A (cyp A) protein, a nucleic acid having a nucleotide sequence coding for the cyp A protein, or a recombinant vector for expressing the cyp A protein for preventing alopecia or improving hair restoration. The composition of the present invention is administered to skin cells in order to suppress the IL-1 expression of skin cells, regulate the activity of ERK and c-jun, and increase the expression of NF- κ B p65, thereby promoting growth and development of hair follicles. Thus, the present invention can be valuable in the use thereof for the preventing and treatment of alopecia-related diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 사이클로필린 A(CypA) 단백질, CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 CypA 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 피부 세포내로 투여되어 피부 세포의 IL-1 발현을 억제하고, ERK 및 c-jun의 활성을 조절하며, NF- κ B p65 발현을 증가시키고, 이를 통해 모발 모낭의 성장 및 발달을 촉진하여, 탈모 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 사이클로필린 A를 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 사이클로필린 A(CypA) 단백질, CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산, 또는 CypA 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 모발(hair)은 피부기름샘(sebaceous gland), 땀샘, 및 손톱과 함께 부가적인 외피(integument) 구조로 인식되는 신체 보호 기관이다. 모발 성장은 매우 잘 조절되는 순환 과정으로, 포유류에서는 아나젠(anagen, growing phase), 카타젠(catagen, regressing phase), 및 텔로젠(telogen, resting phase)의 세 가지 구분되는 국면으로 정의된다. 카타젠 기간 동안 모발 모낭의 퇴행은 근위 상피 모구(proximal epithelial hair bulb)의 말단 분화와 아콤파토시스, 모낭주위 단백질분해(perifollicular proteolysis), 및 모낭 멜라닌 생성(follicular melanogenesis) 완료 등 매트릭스 리모델링을 특징으로 하는 엄격하게 조절된 프로세스를 반영한다.
- [3] 탈모(hair loss)는 인간에게 감정적으로 고통을 주는 질병이다. 또한, 탈모는 많은 인간의 질병과 연관되어 있다. 질병, 영양 결핍, 노화, 호르몬 불균형, 및 스트레스 등을 포함하여 탈모를 일으키는 많은 원인들이 있다.
- [4] 모발 모낭의 성장과 발달은 많은 성장 인자 및 사이토카인과 상호작용한다. 가장 많이 알려진 인자로 각질세포 성장 인자(keratinocyte growth factor, KGF)와 인터루킨-1(Interleukin-1, IL-1)이 있다. 특히, 인터루킨-1의 조절은 모발 모낭의 증식과 발달에 직접 연관되어 있다.
- [5] 모발 성장에 대한 연간 추정 시장은 수십억 달러에 달한다. 그러나, 항-고혈압 칼륨 채널 조절약물(anti-hypertensive potassium channel opener)인 미녹시딜(minoxidil)과 다이하이드로테스토스테론-억제 5 α -환원효소 억제제(dihydrotestosterone-suppressing 5 α -reductase inhibitor)인 피나스테리드(finasteride)의 2개의 탈모 방지 약물만이 FDA의 승인을 받은 상태이다. 이중 미녹시딜은 작용 기전에 대한 보고가 명확하지 않고, 가벼운 두피자극과 알레르기성 피부염 등의 부작용이 보고되었으며, 약 30%의 환자에게만 모발 성장의 효과를 보였고, 일반적인 원형탈모 환자 외에는 효과가 없는 상황이다. 또한, 피나스테리드는 남성 호르몬대사에 작용하는 효소활성 억제제가 작용기전으로 알려져 있고, 성욕 감퇴, 발기부전, 여성용 유방 등의 부작용이 보고되었으며, 특히, 약물에 내재된 독성으로 인하여 임산부에게 사용이 금지되고 있다.

- [6] 국내에서도 탈모 관련 많은 연구들이 진행되고 있으며, 최근에는 면역억제제인 사이클로스포린 A(Cyclosporine A)의 발모효과가 보고 된 바 있으나, 여러 가지 부작용(간 독성, 면역 억제 효과, 신장독성, 고혈압, 중성지질증가 등)으로 인하여 실제 임상 치료에서 적용에는 무리가 있는 실정이다.
- [7] 따라서 독성이나 부작용이 적으며 효과가 뛰어난 탈모 치료제의 개발이 시급한 실정이다.
- [8]
- [9] 한편, 사이클로필린(Cyclophilins, Cyps)은 면역억제 사이클로스포린 A(immunosuppressant Cyclosporin A, CsA)에 높은 친화력(high affinity)을 갖는 단백질로 처음 발견되었다. 사이클로필린들은 전사 조절(transcriptional regulation), 면역 반응(immune response), 단백질 분비(protein secretion), 및 미토콘드리아 기능(mitochondrial function) 조절을 포함하는 여러 세포 반응에 작용한다.
- [10] 사이클로필린은 단백질 폴딩(protein folding) 및 추가적인 세포 과정(cellular process)을 촉진하는 아미노 말단(amino-terminal)에서의 프롤린 잔기로의 펩타이드 결합의 시스-트랜스 변환을 촉매하는 펩타이드-프롤린 시스-트랜스 이소머라제(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase) 활성을 갖는다. 포유류에서는, 10개 이상의 사이클로필린 서브타입(subtype)이 있다. 사이클로필린 A는 이뮤노필린 패밀리(immunophilin family)에 속하는 도처에 편재하는 단백질이다. 사이클로필린 A의 기능은 암세포 저항, 알츠하이머 질환, C형 간염 바이러스 복제와 같은 몇몇 질환에서 많이 연구되고 있다. 또한, 사이클로필린 A는 혈관 평활근 세포(vascular smooth muscle cell)에서 성장 인자와 같은 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [11]
- [12] 그러나, 탈모 관련 질환에서 CypA의 탈모 방지 및 발모 개선과 관련된 역할에 대해서는 전혀 밝혀진 바가 없었다.
- [13] 이런 배경 하에서, 본 발명자들은 이뮤노필린(immunophilin) 패밀리 중 하나로, PPIase 활성을 가지는 사이클로필린 A를 탈모 방지 및 발모 개선에 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 따라서, 본 발명의 목적은 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선 조성물을 제공하는데 있다.
- [15] 본 발명의 다른 목적은 CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선 조성물을 제공하는데 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 목적은 CypA 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선 조성물을 제공하는데 있다.

- [17] 본 발명의 또 다른 목적은 CypA 단백질의 발현을 촉진시키는 물질을 검정하여 탈모를 방지하고 탈모를 개선하는 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [18] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 포함하는 탈모 방지 및 탈모 개선을 위한 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명의 조성물에 사용되는 CypA 단백질은 효모, 식물 또는 동물 유래의 모든 CypA 단백질을 포함한다. 야생형(wild type)의 CypA 단백질을 포함하여, 세포내에서 탈모 방지 및 탈모 개선 기능을 하는 한, 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 CypA 단백질의 변이체를 포함한다. 하나의 구체적 예시로서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 야생형(wild type)의 CypA 단백질, 또는 PPIase 효소 활성화에 결함이 있는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 CypA 단백질을 들 수 있으며, 이러한 서열의 치환, 삽입, 결실 변이체도 본 발명의 조성물에 사용할 수 있다.
- [20] CypA 단백질의 변이체란 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능할 수 있다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 잔기로 이루어지나, 일부의 경우에는 도메인 중 하나가 결실될 수 있는 것과 같이 보다 큰 결실 또한 가능할 수 있다. 이런 변이체는 당해 분야에 공지된 화학적 펩타이드 합성방법 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989). 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [21] 또한, CypA 단백질은 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.
- [22] 상기 변이체 또는 수식체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이나, 필요에 따라서는 이의 단백질의 특성을 변형시킨 변이체 또는 수식체일 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열상의 변이와 수식에 의해서 단백질의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질이다.
- [23] CypA 단백질은 당해 기술분야에 널리 공지된 방법으로 천연에서 추출 및

정제하여 얻을 수 있다. 달리, CypA 단백질의 서열이 밝혀져 있으므로 화학적으로 합성(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 85:2149-2156, 1963)하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당해 기술분야에 널리 공지된 폴리펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, CypA를 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 CypA가 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 CypA를 회수하는 과정으로 수득할 수 있다.

- [24] CypA 단백질을 발현시키기 위한 발현벡터는 통상의 모든 발현 벡터를 다 사용할 수 있다. 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 사용될 수 있는 숙주세포로는 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)) 등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포가 있다.
- [25] 단백질은 선택된 숙주세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다(Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).
- [26] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는, 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 조성물을 제공한다.
- [27] 본 발명의 조성물에서 CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [28] CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수

있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토 프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

- [29] CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 대한 하나의 구체적 예시로서 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 들 수 있으며, 서열번호 3의 서열을 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서, 서열번호 4의 서열을 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.
- [30] 상기한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [31] 바람직한 양태에서, CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 이를 발현하는 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터에 제공된다.
- [32] 본 발명에서 "벡터"란 목적 유전자를 코딩하는 핵산 서열(예: DNA, RNA 등)을 숙주세포로 도입하기 위한 수단을 의미한다. 본 발명에서 "발현 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [33] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [34] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서와 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제가 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [35] CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 당해

기술분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 직접 주사하거나(Wolff et al., Science, 247:1465-8, 1990; Wolff et al., J Cell Sci. 103:1249-59, 1992), 리포솜(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer) 등을 이용하여 탈모 질환의 치료 또는 예방의 목적으로 환자 세포 안으로 전달될 수 있다. 리포솜은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP 등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체가 형성된다. 이 복합체는 세포내로 엔도사이토시스되어 엔도솜 내에 체류하게 된다(Schaefer-Ridder M et al., Science, 215(4529):166-168, 1982; Hodgson et al., Nat Biotechnol., 14(3):339-342, 1996). 엔도솜에서 유입된 유전자가 세포질을 거쳐 핵으로 이동하는 정도가 유전자 전이와 치료 효율을 결정하게 된다. 이런 유전자 전이 방법은 면역원성이 낮아서 반복 투여가 가능하고 안전성이 높은 장점이 있다. 유전자 수송에 사용되는 양이온성 고분자로는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 스퍼민(spermine), 폴리에틸렌이민(PEI: polyethylenimine), 키토산(chitosan) 등이 있다(Hashida, Br J Cancer., 90(6):1252-1258, 2004; Wiseman, Gene Ther., 10(19):1654-1662, 2003; Koping-Hoggard, Gene Ther., 8(14):1108-1121, 2001). 유전자를 양이온성 고분자와 복합체 형태로 체내 투여할 경우 유전자의 체내 체류시간 및 발현 지속시간이 네이키드 DNA(naked DNA)에 비하여 현저히 증가하는 것으로 밝혀졌다.

- [36] 또 다른 양태로서, 본 발명은 CypA 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 탈모 방지 및 탈모 개선을 위한 조성물을 제공한다. 상기 CypA 단백질 발현 재조합 벡터는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [37] CypA를 발현하도록 조작된 재조합 벡터를 탈모가 진행된 환자의 세포로 트랜스펙션할 경우, 그 발현 효율을 증대시킬 수 있기 때문에 치료 효과가 우수하다.
- [38] 유전자 요법에서 사용하는 벡터는 바이러스 벡터일 수 있으며, 예를 들면, 이들로 한정되는 것은 아니지만 복제결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스가 포함된다. 바이러스 벡터는 다음의 기준을 충족해야 한다: (1) 벡터는 원하는 세포에 감염할 수 있어야 하며 이에 따라 적절한 숙주 범위를 갖는 바이러스 벡터가 선택되어야 하고; (2) 전달된 유전자는 적절한 기간 동안 세포에서 보존되고 발현될 수 있어야 하며; (3) 벡터는 숙주에 안전해야 한다. 세포 내로 유전자 전달을 위해 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터로는 몰로니 뮤린 류케미아 바이러스(MMLV)와 같은 레트로바이러스; JC, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스와 같은 파코마바이러스; 엡스타인-바르 바이러스(EBV); 보바인 파필로마 바이러스 타입 I(BPV)와 같은 파필로마 바이러스; 백시니아 및 폴리오바이러스 및 기타 사람 및 동물 바이러스가

포함된다. 다른 방법으로서, 비바이러스성 및 비단백질성 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA, 지질 전달 비히클 및 네이키드 DNA를 포함한 많은 방법 및 전달 비히클이 사용될 수 있다.

- [39] 숙주 발현 시스템은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있으며, 다양한 양태로 사용된다. 포유동물 프로모터는 포유동물 RNA 폴리머라제와 결합하고 사이클로필린 단백질의 코딩 서열을 mRNA로 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 DNA 서열은 어느 것도 가능하다.
- [40] 프로모터는 보통 코딩 서열의 5' 말단에 근접하여 위치하고 있는 전사 개시 영역 및 전사 개시 부위의 상류에 위치한 25 내지 30개의 염기쌍을 이용하는 TATA 박스를 갖는다. TATA 박스는 정확한 위치에서 RNA 합성이 이루어지도록 RNA 폴리머라제 II를 지시하는 것으로 여겨진다. 포유동물 프로모터는 또한 전형적으로 TATA 박스의 100 내지 200개 염기쌍 상류에 위치한 상류 프로모터 요소를 함유한다. 상류 프로모터 요소는 전사 개시 속도를 결정하며 어느 방향으로든 작용할 수 있다. 포유동물 프로모터로 특별히 사용될 수 있는 것은 포유동물 바이러스 유전자로부터 유래된 프로모터인데, 그 이유는 바이러스 유전자가 흔히 고도로 발현되고 넓은 숙주 범위를 갖고 있기 때문이다. 이의 예로는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 메이저 후기 프로모터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 프로모터를 들 수 있다.
- [41] 하나의 예로서, 사이클로필린 유전자를 T7 발현 벡터(Rosenberg, et al., Gene, 56:125-135, 1987)와 같이 아주 치밀하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결시킴으로써 달성할 수 있다. 강력한 벡터의 삽입은 사이클로필린 유전자의 양쪽 말단 근처에 간편한 제한 표적과 그 프로모터 근처에 벡터상에 적격한 제한 표적을 동정하고 사이클로필린 유전자가 그 강력한 프로모터의 전사 및 해독 조절하에 배향하도록 벡터내로 삽입시켜 달성할 수 있다. 다른 방법으로서, 사이클로필린 유전자는 이 유전자의 상류에 강력한 리보솜 결합 부위를 설정하여 유전자의 발현을 증가시킴으로써 과발현될 수 있다(Shine and Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346, 1974).
- [42] 전형적으로 포유동물 세포에 의해 인지되는 전사 종결 및 폴리아데닐화 서열은 해독 종결 코돈의 3'에 위치한 조절 영역이며, 이에 따라 프로모터 요소와 함께 코딩 서열에 인접한다. 성숙 mRNA의 3' 말단은 부위-특정 해독 후 절단 및 폴리아데닐화에 의해 형성된다. 전사 터미네이터 및 폴리아데닐화 시그날의 예로는 SV40으로부터 유래된 것을 들 수 있다.
- [43] 상기한 바와 같은 CypA 단백질, CypA 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산, 또는 CypA 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 본 발명의 조성물은 탈모 질환을 치료 또는 예방하는데 사용할 수 있다.
- [44] 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 주사형태 또는 도포제로 제형화할 수 있다.

주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

- [45] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 또는 국소적용(topical application)할 수 있으며, 용량은 하루에 $0.001\mu\text{g}\sim 10\text{mg/kg}$ 의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [46] 또한, 본 발명에 따른 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 CypA 단백질 등을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.
- [47] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 사이클로필린 A(CypA) 단백질 발현 세포를 배양하는 (a) 단계, 단계 (a)의 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 (b) 단계, 단계 (b)에서의 사이클로필린 A(CypA) 단백질의 발현량을 후보 화합물과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 (c) 단계, 및 사이클로필린 A(CypA) 단백질 발현량의 증가를 나타내는 화합물을 확인하는 (d) 단계를 포함하는, 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 약물을 스크리닝하는 방법을 제공한다. 상기한 방법에서, CypA 단백질의 발현량의 차이는 단백질 수준 또는 mRNA 수준에서 확인할 수 있다. 상기 스크리닝된 약물을 이용하여, 세포 내 CypA 발현량을 증가시킬 수 있으며, 바람직하게는 피부 세포 내 CypA 발현량을 증가시킬 수 있다.
- [48] 단백질 발현량의 수준은 각각의 단백질을 겔에 로딩한 후 전기 영동을 통해서 확인할 수 있으나, 바람직하게는 CypA 단백질에 대한 항체를 이용한 항원-항체 복합체 형성량을 통해 면역검정법으로 확인할 수 있다. 이러한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, RIA, 면역침전 분석법 등이 있다.
- [49] 상기 검출 방법에서 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이들로 제한되는 것은 아니다. 항원-항체 복합체 형성을 검출하기 위해 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법을 이용할 수 있으며, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[50] mRNA 발현량의 수준은 CypA 단백질에 특이적인 프라이머를 이용하여 확인할 수 있다. 구체적인 분석 방법으로는 RT-PCR 또는 노던 블롯 등이 있다. 밴드의 패턴과 강도를 확인함으로써 CypA의 mRNA로의 전사를 정량적으로 측정할 수 있는 간편한 분석방법인 RT-PCR이 바람직하다.

[51] 본 발명의 구체적인 실시예에서, CypA 단백질의 처리는 IL-1 발현을 억제하고, ERK 및 c-jun의 활성을 조절하며, NF-kB p65 발현을 증가시킴으로써 모발 모낭 성장을 촉진시키고, 이를 통해 탈모 방지 및 발모 개선 효과를 나타내는 것을 구체적으로 확인하였다.

발명의 효과

[52] 본 발명의 사이클로필린 A를 포함하는 조성물은 피부 세포내로 투여되어 피부 세포의 IL-1 발현을 억제하고, ERK 및 c-jun의 활성을 조절하며, NF-kB p65 발현을 증가시키고, 이에 의해 모발 모낭의 성장 및 발달을 촉진하여, 탈모 질환의 예방 및 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[53] 도 1a 및 1b는 각각 CypA/WT 단백질이 C57BL/6 마우스의 모발 성장에 미치는 효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[54] 도 2는 비교예(Vesicle), CypA/WT 단백질 처리군, 및 CypA/R55A 단백질 처리군 마우스 피부의 조직학적 특징을 나타내는 사진이다.

[55] 도 3a 내지 3c는 Vesicle(V), CypA/WT 단백질(W), 및 CypA/R55A 단백질(R) 처리 후 C57BL/6 마우스 피부에서 단백질의 발현 수준을 분석한 도면이다.

[56] 도 4는 비교예(Vesicle) 및 CypA/WT 단백질을 C57BL/6 마우스 피부에 국소 처리한 후, NF-kB p65의 발현 유도를 분석한 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

[57] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[58]

[59] 실험재료 및 방법

[60] 실시예 1: 재조합 단백질(recombinant protein)의 제조

[61] 서열번호 3 및 서열번호 4의 뉴클레오타이드를 각각 pGEX-KG 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제작하고, Top10F 박테리아 세포에 형질전환하였다. 형질전환된 박테리아 5ml를 100μg/ml의 암피실린을 포함하는 LB 배지(Luria broth, 500ml)에 접종하고, 37°C에서 오비탈 셰이커(orbital shaker)를 사용하여 밤새(overnight) 배양하였다. 박테리아는 A600(Absorption 600)이 0.4가 될 때까지 배양하였고, 0.2mM의 이소프로필-1-티오-b-D 갈락토피라노사이드(isopropyl-1-thio-b-D galactopyranoside, Sigma Aldrich, Germany)를 이용하여 유도(induction)하였으며, 37°C에서 4시간 동안 교반하였다.

세포를 수득하기 위해 배양액을 3000rpm에서 30분 동안 원심 분리하였고, 펠릿(pellet)을 200mM PMSF를 포함하는 PBS-T 용액에 현탁하였다. 현탁된 박테리아 세포를 소니케이션(20초 펄스 인터벌 15분 조건, 5회 반복)을 사용하여 용해(lyse)시켰다. 재조합 단백질은 글루타싸이온-세파로오스(glutathione-Sepharose, Sigma Aldrich, Germany)에 결합시켜 정제하였고, 트롬빈(thrombin, Sigma Aldrich, Germany)을 이용하여 절단하였다. 인산 완충 식염수(phosphate-buffered saline)로 용출하여 GST-hCypA/WT 및 GST-hCypA/R55A 재조합 단백질을 각각 수득하였다.

[62]

[63] **실시예 2: 실험동물**

[64] 생후 6주된 암컷 C57BL/6 마우스는 중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입하였고, 1주간 음식과 물을 급이하여 동물 사육실 환경에 순응시켰다.

[65] 각 4마리의 마우스를 하나의 실험군으로 하여, 3개의 군, 총 12마리의 마우스를 본 실험에 사용하였다. 모든 모낭(follicle)이 휴지기(telogen stage)에 들어가는, 생후 7주령에 마우스의 등을 동물용 가위로 조심스럽게 면도하였다. 면도 후 다음 날(Day 1)부터, 매일 각각의 실험군들에 10 μ g CypA/R55A 재조합 단백질, 10 μ g(대략 60 μ M) CypA/WT 재조합 단백질, 및 10 μ l 용출 버퍼(비교예, elution buffer, vesicle)로 처리하였다. 각 1일, 4일, 12일, 및 20일 경과 시에, 각 실험군으로부터 한 마리의 마우스를 희생하여, 피부 검체(skin specimen)를 얻었다.

[66]

[67] **실시예 3: 이뮤노블롯(Immunoblot) 분석**[68] 소듐바나테이트(NaVO₄) 및 프로테아제 억제 콕테일(protease inhibitor cocktail, 진-디포트, 한국)을 포함하는 용출 버퍼(50mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP-40)로 마우스 피부 조직을 균질화(homogenize)하였다. 전체 용해물(lysate)을 SDS-PAGE 겔(12%)에 로딩하여 전기영동을 수행한 후, 나이트로셀룰로오스 멤브레인에 옮겼다.

[69] 상기 멤브레인을 5% BSA로 1시간 동안 블록하고 세척한 후, 4°C에서 1차 항체로 밤새(overnight) 배양하였다. 2차 항체로 45분간 계속해서 배양한 후, 단백질을 웨스턴 블롯 루미널 시약(enhanced Western Blotting Luminol Reagent, Santa cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA)으로 시각화(visualize)하였다.

[70]

[71] **실시예 4: 조직학(histological) 연구**[72] 등쪽(dorsal) 피부를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에 유지하고, 최적 절단 온도 복합기(optimal cutting temperature(OCT) compound, Leica Microsystems, USA)에 내장한 후, 급속하게 냉동시켰다. 12 μ m 절편을 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 탑재하였다. 절편을 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하였다.

[73]

[74] **실시예 5: 면역조직화학(Immunohistochemistry)**

[75] 각각의 단백질의 발현 수준을 면역조직화학을 통해 분석하였다. 샘플을 4°C에서 5분 동안 메탄올(MeOH)로 고정하고, 상온에서 2시간 동안 2% 정상 염소 혈장(normal goat serum, Vector laboratories, USA)으로 블록하였다. 블록된 검체(specimen)를 단일클론(monoclonal) 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후, PBS 용액으로 세척하고, 퍼옥시다아제가 결합된 2차 항체로 반응시켰다. 면역염색된 단면(section)을 다코 엔비전 검출 키트(Dako EnVision Detection Kit, Dako, Denmark)를 사용하여 시각화하였다.

[76]

[77] **결과**[78] **1. CypA 단백질 유도 마우스 모발 성장**

[79] 모발 성장에 CypA 단백질의 기능을 연구하기 위하여, C57BL/6 마우스의 등쪽 피부에 CypA 단백질을 국소적으로 매일 도포하고, 피부색의 변화를 관찰하였다. 검은 색소침착(black pigmentation)이 나타나면, 모발 모낭이 휴지기(telogen phase)에서 성장기(anagen phase)로 전이됨의 증거가 될 수 있다. 등쪽 피부의 색은 국소 처리 후 12일부터 변화하였다. 관찰 마지막 일인 처리 20일 후에 CypA/WT 단백질이 처리된 마우스 피부는 훨씬 길고 많은 모발 성장을 보였다(도 1a).

[80] 국소 처리 1일 및 20일 후에 랜덤하게 뽑은 5개의 모발(n=5)의 평균 길이를 측정하였다. 비교예의 마우스와 비교하여, CypA/WT 단백질 처리는 대략 3.5배의 모발 성장을 촉진하였다. PPIase(peptidyl-prolyl isomerases) 효소 활성이 결여된 뮤텐트 CypA/R55A 단백질 처리도 CypA/WT 단백질 처리 결과와 유사한 효과를 보였다(도 1b).

[81]

[82] **2. 모발 모낭 수 및 신장(elongation)에 작용하는 CypA 단백질의 효과**

[83] 모발 모낭(hair follicle) 성장에 작용하는 CypA 단백질의 역할을 조사하기 위하여, 마우스 등쪽 피부 검체를 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색을 수행하였다. 비교예(vesicle)와 비교할 때, CypA/WT 단백질이 처리된 마우스는 12일부터 훨씬 신장된 모발 모낭(hair follicle)들이 관찰되었다(도 2).

[84]

[85] **3. CypA 단백질에 의해 다양하게 조절되는 단백질의 확인**

[86] CypA 단백질의 모발 성장 조절을 측정하기 위하여 여러 단백질의 발현을 분석하였다. 각각의 검체를 균질화(homogenize)하고, SDS-PAGE로 분리한 후, 각각의 항체로 검출하였다. 우선 인터루킨-1(Interleukin-1, IL-1)과 사이클로옥시게나아제 2(Cyclooxygenase 2, Cox 2)의 발현을 모니터링하였다. 염증(Inflammation) 및 관련된 생리학적 현상은 탈모의 원인 중 하나이다. 인터루킨-1 α (Interleukin-1 alpha, IL-1 α) 및 인터루킨-1 β (Interleukin-1 beta,

IL-1 β)는 면역 반응, 염증 반응, 및 혈액생성(hematopoiesis)의 조절에 관여하는 사이토카인(cytokine)이다. 또한 IL-1은 모발 성장 억제를 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. 그리고, Cox 2는 염증과 통증 조절에 밀접하게 연관되어 있다. COX 발현의 약리학적 억제는 염증 및 통증의 경감을 제공할 수 있다. 도 3a에서 나타나듯이, CypA/WT 단백질의 처리는 IL-1 발현을 억제하였다. 그러나, Cox 2의 발현은 비교예(vesicle)와 CypA/WT 처리 검체 사이에서 차이점이 없었다.

[87] 다음으로, ERK, p38 및 c-jun과 같은 세포 증식과 연관된 키나아제 발현을 모니터링하였다. 도 3b에서 나타나듯이, CypA/WT 단백질은 ERK 및 c-jun의 활성을 조절하지만, p38의 활성화에는 유의한 차이점을 나타내지 않았다.

[88] 마지막으로, 말단 분화 마커(terminal differentiation marker)인 인볼루크린(involucrin)과 프로아폽토시스 마커인 bax의 발현 수준을 측정하였다. 그 결과, CypA/WT 단백질의 처리는 이들 분화 및 프로아폽토시스 마커의 발현에 영향을 미치지 않았다(도 3c).

[89]

[90] **4. CypA/WT 단백질의 NF-kB p65 발현 조절**

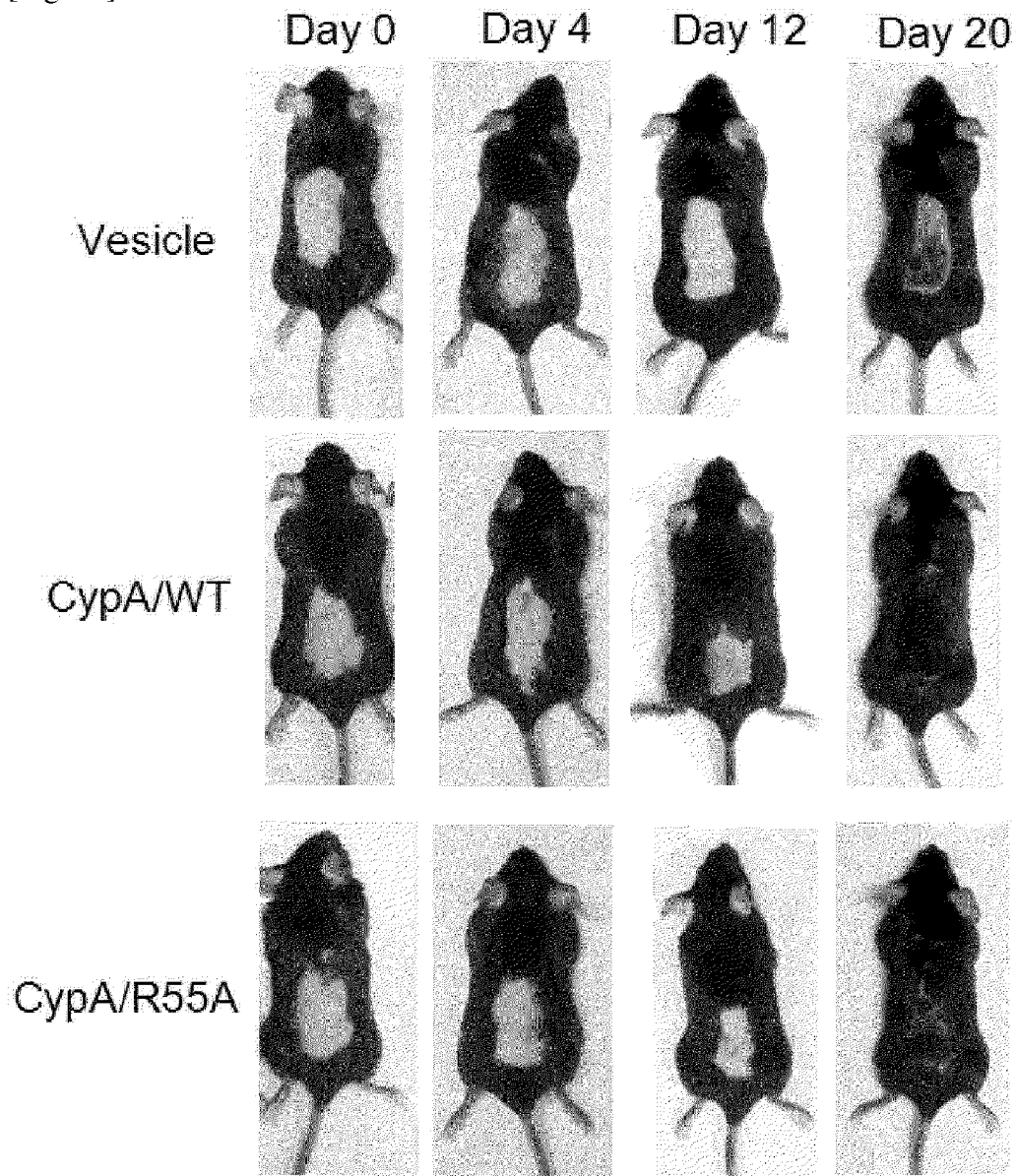
[91] 피부 검체에서 NF-kB p65의 발현 수준을 분석하였다. NF-kB p65는 모발 모낭 성장 및 발육(development)의 표적 물질 중 하나이다. 활성화된 NF-kB는 Wnt, 및 Shh와 같은 하위 유전자(downstream gene)를 조절한다. 결과적으로, 모발 모낭은 성장하거나 발달되도록 유도된다.

[92] 분석결과, CypA/WT 처리된 마우스 피부에서 NF-kB p65 발현이 증가되었다(도 4).

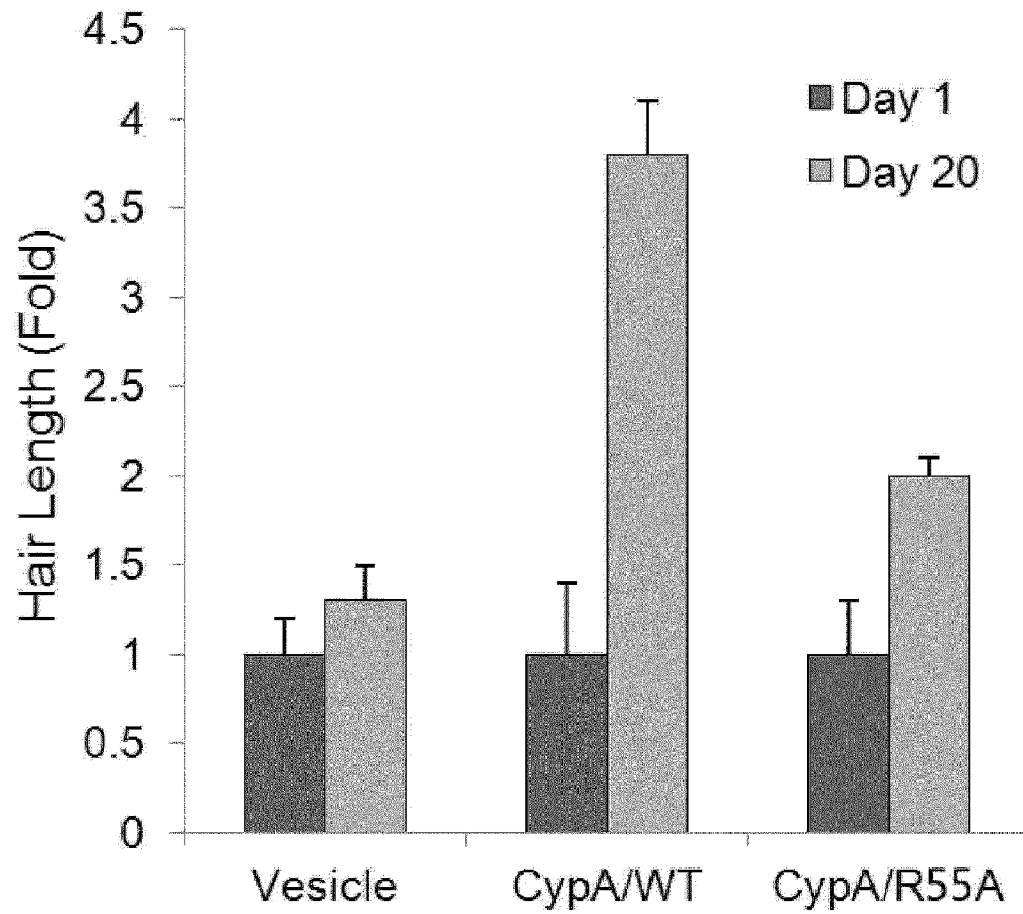
청구범위

- [청구항 1] 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 포함하는 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 사이클로필린 A(CypA) 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는, 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 사이클로필린 A(CypA) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 서열번호 3 또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] (a) 사이클로필린 A(CypA) 단백질 발현 세포를 배양하는 단계,
(b) 단계 (a)의 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계,
(c) 단계 (b)에서의 사이클로필린 A(CypA) 단백질의 발현량을 후보 화합물과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 단계, 및
(d) 사이클로필린 A(CypA) 단백질 발현량의 증가를 나타내는 화합물을 확인하는 단계를 포함하는, 탈모 방지 및 발모 개선을 위한 약물을 스크리닝하는 방법.

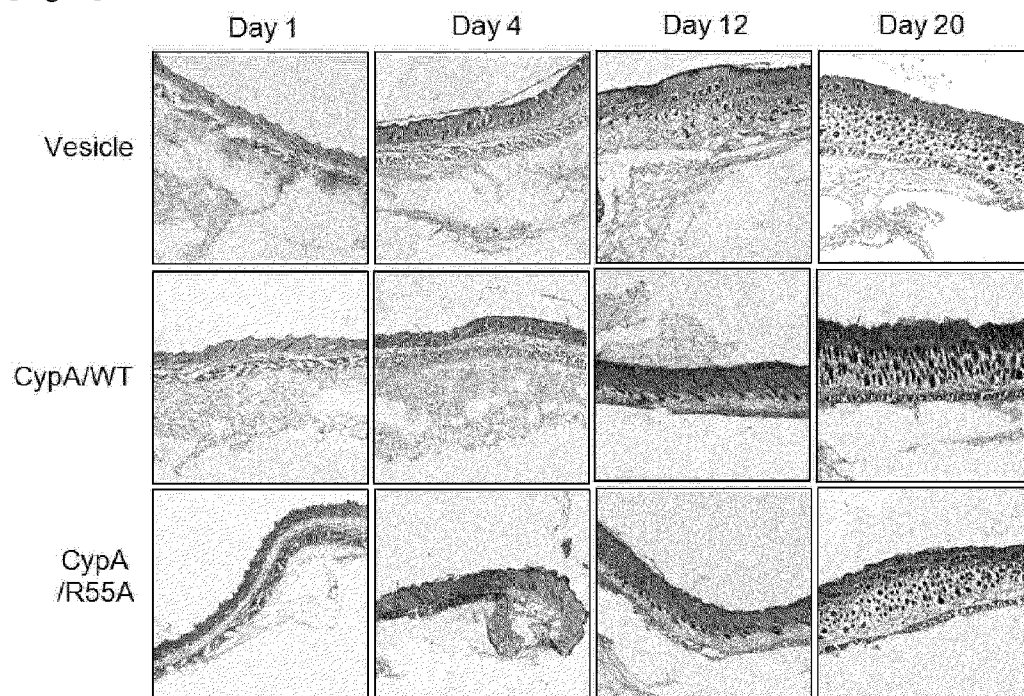
[Fig. 1a]



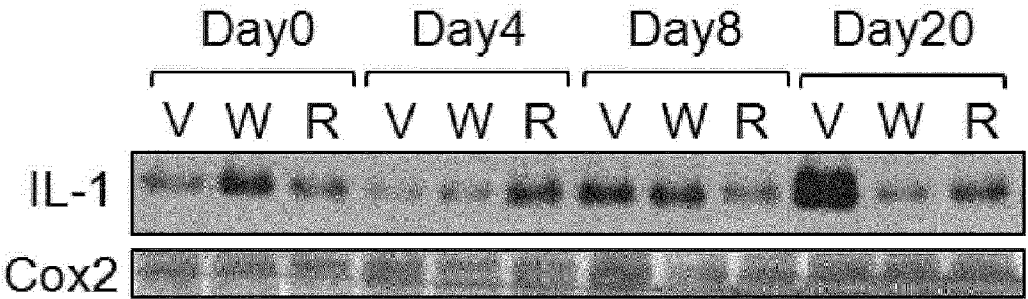
[Fig. 1b]



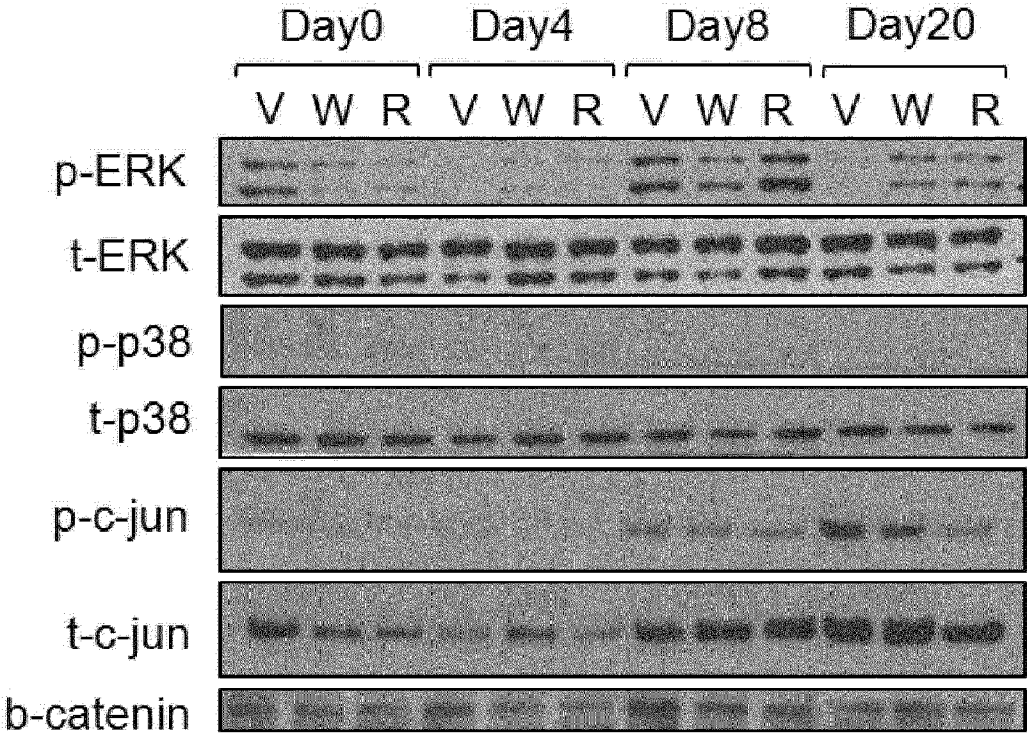
[Fig. 2]



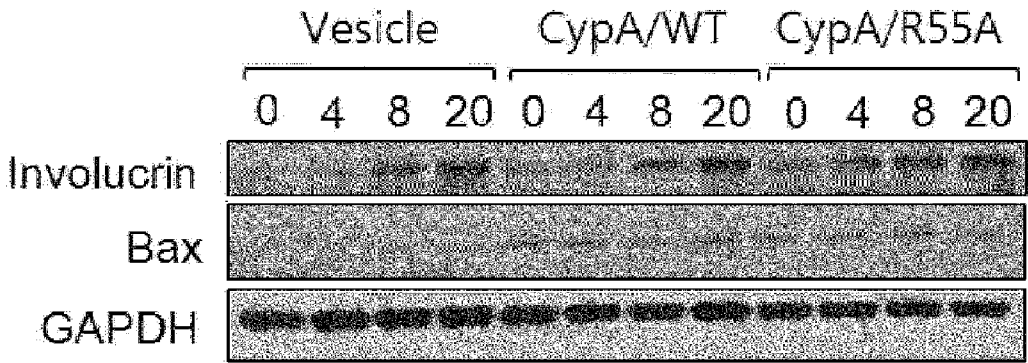
[Fig. 3a]



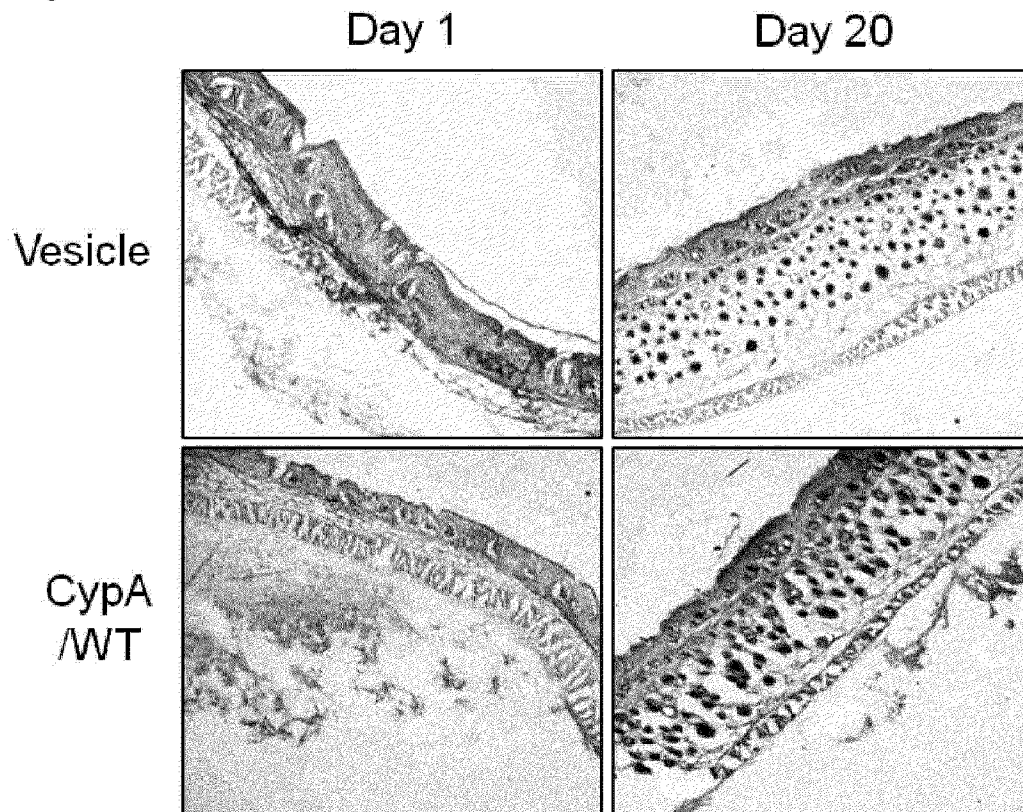
[Fig. 3b]



[Fig. 3c]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/008164**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 17/14(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)

A61K 38/17; A61K 31/136; G01N 33/15; A61K 31/12; A61K 38/16; A61K 7/06

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: cyclosporine A, prevention of hair loss, screening

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-174041 A (SHISEIDO CO., LTD.) 02 July 1999 See abstract and claims 1-7.	1-6
A	US 2010-0041747 A1 (FISCHER et al.) 18 February 2010 See the entire document.	1-6
A	MOSCOSO-SOLORZANO et al., "Cyclophilin A as a mediator of tissue injury and nephrotoxicity" Nephrology Reviews, vol. 4, no. 2, Article no. e9, pp. 42-44 (17 July 2012) See the entire document.	1-6
A	SOLASSOL et al., "FKBP family proteins as promising new biomarkers for cancer" Current Opinion in Pharmacology, vol. 11, no. 4, pp. 320-325 (2011) See the entire document.	1-6
A	CIESEK et al., "Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A" Hepatology, vol. 50, no. 5, pp. 1638-1645 (2009) See the entire document.	1-6



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

"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

27 NOVEMBER 2013 (27.11.2013)

Date of mailing of the international search report

02 DECEMBER 2013 (02.12.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/008164

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOE et al., "Cyclophilin A: A mediator of cardiovascular pathology" Journal of the Korean Society of Hypertension, vol. 17, no. 4, pp. 133-147 (2011) See the entire document.	1-6
A	KR 10-0641295 B1 (KIM, Sung-Soo) 31 October 2006 See the entire document.	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/008164

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 11-174041 A	02/07/1999	NONE	
US 2010-0041747 A1	18/02/2010	EP 2056806 A2	13/05/2009
		WO 2008-019823 A2	21/02/2008
		WO 2008-019823 A3	28/08/2008
KR 10-0641295 B1	31/10/2006	KR 10-2004-0041458 A	17/05/2004
		US 2005-0074438 A1	07/04/2005
		US 2008-0181875 A1	31/07/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 17/14(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 38/17; A61K 31/136; G01N 33/15; A61K 31/12; A61K 38/16; A61K 7/06 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: 사이클로필린 A, 탈모 방지, 스크리닝		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 11-174041 A (SHISEIDO CO., LTD.) 1999.07.02. 요약 및 청구항 1-7 참조.	1-6
A	US 2010-0041747 A1 (FISCHER 외) 2010.02.18. 전체 문서 참조.	1-6
A	MOSCOSO-SOLORZANO 외, `Cyclophilin A as a mediator of tissue injure and nephrotoxicity` Nephrology Reviews, Vol.4, No.2, Article No.e9, pp.42-44 (2012.07.17.) 전체 문서 참조.	1-6
A	SOLASSOL 외, `FKBP family proteins as promising new biomarkers for cancer` Current Opinion in Pharmacology, Vol.11, No.4, pp.320-325 (2011) 전체 문서 참조.	1-6
A	CIESEK 외, `Cyclosporine A inhibits hepatitis C virus nonstructural protein 2 through cyclophilin A` Hepatology, Vol.50, No.5, pp.1638-1645 (2009) 전체 문서 참조.	1-6
☒ 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 “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 “T” 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 2013년 11월 27일 (27.11.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 12월 02일 (02.12.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SOE 외, `Cyclophilin A: A mediator of cardiovascular pathology` Journal of the Korean Society of Hypertension, Vol.17, No.4, pp.133-147 (2011) 전체 문서 참조.	1-6
A	KR 10-0641295 B1 (김성수) 2006.10.31. 전체 문서 참조.	1-6

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/008164

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 11-174041 A	1999/07/02	없음	
US 2010-0041747 A1	2010/02/18	EP 2056806 A2 WO 2008-019823 A2 WO 2008-019823 A3	2009/05/13 2008/02/21 2008/08/28
KR 10-0641295 B1	2006/10/31	KR 10-2004-0041458 A US 2005-0074438 A1 US 2008-0181875 A1	2004/05/17 2005/04/07 2008/07/31