



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049681
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61M 37/00 (2006.01) A61N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61M 37/0092 (2013.01)
A61N 7/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0137553
(22) 출원일자 2019년10월31일
심사청구일자 2019년10월31일
(30) 우선권주장
1020180132628 2018년10월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
(주) 바이오인프라생명과학
서울특별시 종로구 대학로 49, 7층(연건동)
(72) 발명자
김철우
서울특별시 광진구 아차산로 637, 22동 402호 (광
장동, 위커힐아파트)
박동희
서울특별시 종로구 대학로 49, 7층 (연건동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 수

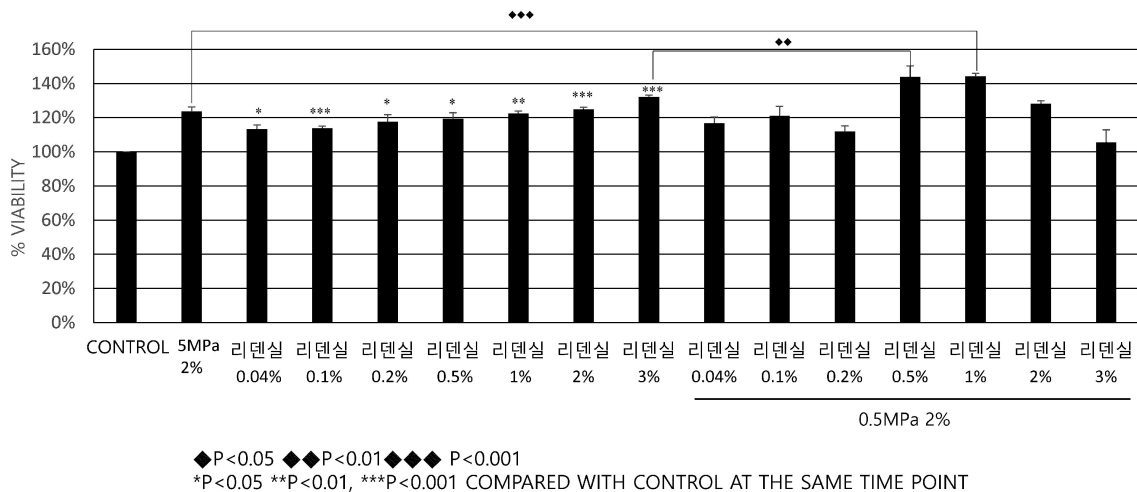
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 약물 전달체를 적용하고, 초음파를 조사하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법 및 이를 이용한 초음파 조사 장치

(57) 요약

초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 방법에 있어서, 대상체의 표피에 약물 및 표피 약물 전달체가 적용되고, 초음파 파라미터들 각각이 소정의 범위로 기설정된 상태에서, 초음파 조사 장치가, 초음파 발생부를 상기 대상체의 표피로부터 임계 범위 내에 위치시킴으로써 상기 대상체의 표피에 초음파를 조사하되, 상기 표피 약물 전달체는 상기 초음파가 조사되면 상기 대상체의 표피 주위에 공동(cavity)을 생성하는 공동화(cavitation)를 유발하고, 상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력 및 초음파의 duty percentage가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%인 것을 특징으로 하는 방법 및 이를 이용한 초음파 조사 장치가 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61M 2037/0007 (2013.01)

A61N 2007/0034 (2013.01)

A61N 2007/0039 (2013.01)

(72) 발명자

원종호

서울특별시 종로구 대학로 49, 7층 (연건동)

오해리

서울특별시 종로구 대학로 49, 7층 (연건동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0541260

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학연협력 기술개발사업

연구과제명 Ultrasound Cavitation seed를 함유하는 탈모 방지 기능성 물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)바이오인프라생명과학

연구기간 2017.10.01 ~ 2018.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 방법에 있어서,

대상체의 표피에 약물 및 표피 약물 전달체가 적용되고, 초음파 파라미터들 각각이 소정의 범위로 기설정된 상태에서, 초음파 조사 장치가, 초음파 발생부를 상기 대상체의 표피로부터 임계 범위 내에 위치시킴으로써 상기 대상체의 표피에 초음파를 조사하되,

상기 표피 약물 전달체는 상기 초음파가 조사되면 상기 대상체의 표피 주위에 공동(cavity)을 생성하는 공동화(cavitation)를 유발하고,

상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력 및 초음파의 duty percentage가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력, 초음파의 duty percentage 및 초음파의 강도(intensity)가 포함되고,

상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%이고, 상기 초음파의 강도는 166.7 mW/cm^2 내지 416.7 mW/cm^2 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 약물은 리덴실(Redensyl)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 리덴실의 농도는 0.5% 내지 1%인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 주파수가 더 포함되고,

상기 초음파의 주파수는 0.5MHz 내지 4.6MHz인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 초음파의 주파수는 1MHz인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 전체 조사 시간이 더 포함되고,

상기 초음파의 전체 조사 시간은 10분 이내인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 세포는 외측모근초(outer root sheath) 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 초음파 조사 장치에 있어서,

초음파 발생부; 및

대상체의 표피에 약물 및 표피 약물 전달체가 적용되고, 초음파 파라미터들 각각이 소정의 범위로 기설정된 상태에서, 상기 대상체의 표피로부터 임계 범위 내에 상기 초음파 발생부를 위치시킴으로써 상기 초음파 발생부로 하여금 상기 대상체의 표피에 초음파를 조사하도록 하는 제어부;

를 포함하되,

상기 표피 약물 전달체는 상기 초음파가 조사되면 상기 대상체의 표피 주위에 공동(cavity)을 생성하는 공동화(cavitation)를 유발하고,

상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력 및 초음파의 duty percentage가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력, 초음파의 duty percentage 및 초음파의 강도(intensity)가 포함되고,

상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%이고, 상기 초음파의 강도는 166.7 mW/cm^2 내지 416.7 mW/cm^2 인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 약물은 리덴실(Redensyl)인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 리덴실의 농도는 0.5% 내지 1%인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 주파수가 더 포함되고,

상기 초음파의 주파수는 0.5MHz 내지 4.6MHz인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 초음파의 주파수는 1MHz인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 전체 조사 시간이 더 포함되고,

상기 초음파의 전체 조사 시간은 10분 이내인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 세포는 외측모근초(outer root sheath) 세포인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 초음파를 조사하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법 및 이를 이용한 초음파 조사 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탈모제로 사용되고 있는 대표적인 물질은 미녹시딜(Minoxidil)과 프로페시아(Propecia)이다. 미녹시딜은 두피에 바르는 제형으로 과거 화이자(Pfizer)사에서 혈관을 확장시키는 효과로 인해 고혈압 치료제로 개발되었으나, 이 마나 손등에 털이 나는 부작용의 연구 끝에, 탈모 치료제로 판매되었다. 미녹시딜의 작용 기전은 명확히 밝혀지지 않았으나 이론적으로 두피의 혈관을 확장시키고, 세포막의 칼륨 채널을 열어 산소 및 영양분을 모낭으로 공급해 탈모를 억제하고, 모발 성장을 촉진하며, 모발을 두껍게 한다고 알려져 있다. 하지만 홍반, 두피건조, 가슴 두근거림, 빈맥, 부정맥 등의 부작용이 발생할 수 있다.

[0003] 머크(Merck)사에서 판매하는 프로페시아(Propecia)의 성분은 피나스테리드(finasteride)로 원래는 전립선비대증을 치료하기 위해 개발되었으나 모발의 성장을 촉진한다는 점을 이용하여 탈모치료제로 사용되고 있다. 5 α -리덕타제(5 α -reductase)는 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone)을 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)으로 전환하는데, DHT는 탈모를 일으키는 주요한 성분이다. 피나스테리드는 이러한 5 α -리덕타제 효소를 억제하여 탈모를 유발하는 DHT의 농도를 저하시킨다. 대표적인 부작용으로는 발기부전, 성욕 감퇴, 성적흥분 장애 등의 성기능 저하와 어지럼증, 두통, 부종 및 피부 발진 등이 있다. 불임이나 정자수가 적은 남성의 경우 약물 복용에 주의를 기울여야 한다. 또한 기형아 출산의 우려가 있어 가임기 여성은 약물 복용 및 접촉을 하면 안 되고, 처방하는 데 제한이 있다.

[0004] 또한 아보다트는 두타스테리드(dutasteride) 계열의 성분으로, 피나스테리드와 마찬가지로 전립선비대증 치료제로 개발되었으나, 탈모 방지라는 효과가 발견되어 탈모 치료제로 사용되고 있다. 일반적으로 피나스테리드 계열보다 두타스테리드가 조금 더 강력한 탈모 억제 효과를 내는 것으로 알려졌다. 하지만 성욕감퇴, 신장 기능 저하 등의 부작용 또한 강한 것으로 알려져 있어 피나스테리드에 비해서 제한적으로 사용되고 있고, 미국에서는 탈모 치료제로서 FDA 승인을 받지 못한 바 있다.

[0005] 상기 약물의 부작용을 감안했을 때, 두피 및 인체에 미치는 부작용을 최소화하면서도 효율적으로 탈모 방지, 모발 굵기 증가 및 모발 흑화를 촉진하는 시스템 개발이 시급하다.

[0006] 탈모 방지 기능성 화장품에 포함되는 원료 물질은 리덴실(Redensyl) 등 여러 가지가 있지만, 이들은 펩타이드, 성장인자 등으로 대부분이 분자량(예를 들어, 0.5~10kDa)이 높기 때문에, 직접 사용할 경우 피부 흡수율이 낮아 피부를 통한 원료 전달이 어려운 한계가 있다.

[0007] 기존의 약물 전달 시스템(Drug Delivery System, DDS)을 이용하더라도 이 또한 피부 흡수율이 낮아, 저분자(<500Da) 원료만이 일부 흡수되는 한계가 있고, 원료 특성(친수성, 소수성, 난용성 등)에 따른 흡수 편차가 크다는 단점이 있다.

[0008] 이온도입치료(iontophoresis)는 적용 부위에 패치 등의 기구를 통해 미세 전류를 발생시켜 전위차를 이용하여 약물의 흡수를 촉진시키는 기술이다. 광범위한 적용이 가능하고 비 침습적이고 통증이 없다는 장점이 있지만, 약물의 극성이 충분하지 않은 경우 적용에 제한이 있고, 약물의 크기나 적용 깊이에 제한이 있을 수 있다. 또한 너무 강한 전류를 적용할 경우 홍반이 생길 수 있고, 가려움증 등의 부작용이 있을 수 있다.

[0009] 미세바늘(microneedle)은 피부에 수백 마이크로미터 깊이의 구멍을 생성하여 약물전달을 한다. 또한, 레이저 시스템(laser system)은 레이저 조사를 통해 표면에 약 5~10 마이크로미터 깊이로 피부를 깎아 탈모 방지 물질을

환자의 피부에 적용할 수 있지만, 위 시스템의 경우 통증이 유발될 수 있고, 피부에 자극을 주어서 홍반 등이 유발될 수 있다. 또한 반복 적용이 힘들고, 넓은 부위의 적용이 어렵다는 단점이 있다.

[0010] 이와 같은 약물 전달 시스템의 한계를 감안했을 때, 비침습적이고 통증없이, 짧은 적용시간에 부작용없이 최소한의 약물을 사용하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법이 요구되는 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상술한 문제점을 모두 해결하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은, 초음파를 조사하여 비침습적으로 통증없이 세포의 생존율을 증가시키는 것을 다른 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은, 약물만을 적용하는 경우에 비해, 같은 농도의 약물을 적용하더라도 표피 약물 전달체 및 초음파를 이용함으로써 세포의 생존율을 더욱 증가시키는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기한 바와 같은 본 발명의 목적을 달성하고, 후술하는 본 발명의 특징적인 효과를 실현하기 위한 본 발명의 특징적인 구성은 다음과 같다.

[0015] 본 발명의 일 태양에 따르면, 초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 방법에 있어서, 대상체의 표피에 약물 및 표피 약물 전달체가 적용되고, 초음파 파라미터들 각각이 소정의 범위로 기설정된 상태에서, 초음파 조사 장치가, 초음파 발생부를 상기 대상체의 표피로부터 임계 범위 내에 위치시킴으로써 상기 대상체의 표피에 초음파를 조사하되, 상기 표피 약물 전달체는 상기 초음파가 조사되면 상기 대상체의 표피 주위에 공동(cavity)을 생성하는 공동화(cavitation)를 유발하고, 상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력 및 초음파의 duty percentage가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0016] 일례로서, 상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력, 초음파의 duty percentage 및 초음파의 강도(intensity)가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%이고, 상기 초음파의 강도는 166.7 mW/cm^2 내지 416.7 mW/cm^2 인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0017] 일례로서, 상기 약물은 리덴실(Redensyl)인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0018] 일례로서, 상기 리덴실의 농도는 0.5% 내지 1%인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0019] 일례로서, 상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 주파수가 더 포함되고, 상기 초음파의 주파수는 0.5MHz 내지 4.6MHz인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0020] 일례로서, 상기 초음파의 주파수는 1MHz인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0021] 일례로서, 상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 전체 조사 시간이 더 포함되고, 상기 초음파의 전체 조사 시간은 10분 이내인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0022] 일례로서, 상기 세포는 외측모근초(outer root sheath) 세포인 것을 특징으로 하는 방법이 개시된다.

[0023] 본 발명의 다른 태양에 따르면, 초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 초음파 조사 장치에 있어서, 초음파 발생부; 및 대상체의 표피에 약물 및 표피 약물 전달체가 적용되고, 초음파 파라미터들 각각이 소정의 범위로 기설정된 상태에서, 상기 대상체의 표피로부터 임계 범위 내에 상기 초음파 발생부를 위치시킴으로써 상기 초음파 발생부로 하여금 상기 대상체의 표피에 초음파를 조사하도록 하는 제어부;를 포함하되, 상기 표피 약물 전달체는 상기 초음파가 조사되면 상기 대상체의 표피 주위에 공동(cavity)을 생성하는 공동화(cavitation)를 유발하고, 상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력 및 초음파의 duty percentage가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0024] 일례로서, 상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력, 초음파의 duty percentage 및 초음파의 강도(intensity)가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1%

내지 5%이고, 상기 초음파의 강도는 166.7 mW/cm^2 내지 416.7 mW/cm^2 인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0025] 일례로서, 상기 약물은 리덴실(Redensyl)인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0026] 일례로서, 상기 리덴실의 농도는 0.5% 내지 1%인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0027] 일례로서, 상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 주파수가 더 포함되고, 상기 초음파의 주파수는 0.5MHz 내지 4.6MHz인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0028] 일례로서, 상기 초음파의 주파수는 1MHz인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0029] 일례로서, 상기 초음파 파라미터들에는 초음파의 전체 조사 시간이 더 포함되고, 상기 초음파의 전체 조사 시간은 10분 이내인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

[0030] 일례로서, 상기 세포는 외측모근초(outer root sheath) 세포인 것을 특징으로 하는 초음파 조사 장치가 개시된다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 의하면, 다음과 같은 효과가 있다.

[0032] 본 발명은, 초음파를 조사하여 비침습적으로 통증없이 세포의 생존율을 증가시키는 효과가 있다.

[0033] 또한, 본 발명은, 약물만을 적용하는 경우에 비해, 같은 농도의 약물을 적용하더라도 표피 약물 전달체 및 초음파를 이용함으로써 세포의 생존율을 더욱 증가시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법에 있어서 초음파의 파라미터들의 개념을 설명하기 위해 개략적으로 도시한 것이고,

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법에 대한 피부 안정성 실험결과를 개략적으로 도시한 것이고,

도 3a 및 도 3b는 기존의 약물만을 적용한 경우, 기존의 약물의 적용 농도에 따른 인간 외측모근초 세포 생존율을 개략적으로 도시한 것이고,

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법에 사용되는 표피 약물 전달체를 개략적으로 도시한 것이고,

도 5 내지 도 21은 초음파의 파라미터들을 달리하였을 때의 초음파의 물리적 영향을 개략적으로 도시한 것이고,

도 22 내지 도 25는 본 발명에 의한 인간 외측모근초 세포의 생존율 실험결과와 약물만을 적용한 경우의 실험결과를 비교한 결과이고,

도 26 내지 도 37은 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사한 경우에 유전자 발현에 관한 실험결과를 개략적으로 도시한 것이고,

도 38 내지 도 41은 본 발명의 일 실시예에 따라 초음파를 조사하였을 때의 DNA methylation 정도를 개략적으로 도시한 것이고,

도 42는 표피 약물 전달체, 약물 및 초음파를 함께 주 2회, 회당 10분씩 적용한 경우 기간의 경과에 따른 자체 임상 결과를 개략적으로 도시한 것이고,

도 43a는 어떠한 방법도 적용되지 않은 상태를 나타내고,

도 43b는 종래 기술을 12개월간 적용한 결과를 나타내고,

도 43c 및 도 43d는 표피 약물 전달체, 약물 및 초음파를 함께 적용한 경우 시간의 경과에 따른 결과를 나타내고,

도 44a 및 도 44b는 표피 약물 전달체, 약물 및 초음파를 함께 적용한 경우 시간의 경과에 따른 결과를 나타낸

것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 후술하는 본 발명에 대한 상세한 설명은, 본 발명이 실시될 수 있는 특정 실시예를 예시로서 도시하는 첨부 도면을 참조한다. 이들 실시예는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있기에 충분하도록 상세히 설명된다. 본 발명의 다양한 실시예는 서로 다르지만 상호 배타적일 필요는 없음이 이해되어야 한다. 예를 들어, 여기에 기재되어 있는 특정 형상, 구조 및 특성은 일 실시예에 관련하여 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 다른 실시예로 구현될 수 있다. 또한, 각각의 개시된 실시예 내의 개별 구성요소의 위치 또는 배치는 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않으면서 변경될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 후술하는 상세한 설명은 한정적인 의미로서 취하려는 것이 아니며, 본 발명의 범위는, 적절하게 설명된다면, 그 청구항들이 주장하는 것과 균등한 모든 범위와 더불어 첨부된 청구항에 의해서만 한정된다. 도면에서 유사한 참조부호는 여러 측면에 걸쳐서 동일하거나 유사한 기능을 지칭한다.
- [0036] 이하, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명의 바람직한 실시예들에 관하여 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.
- [0037] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 방법에 있어서 초음파의 파라미터들의 개념을 설명하기 위한 도면이다.
- [0038] 초음파 파라미터들은 아래와 같다.
- [0039] Frequency: 초음파 자체의 주파수
- [0040] Duty percentage: 초음파가 조사되는 실제 조사 시간을 한 주기로 나눈 백분율 값
- [0041] PRF(pulse repetition frequency): 초음파 구형파(square wave)가 1초동안 조사되는 횟수
- [0042] PRP(pulse repetition period): $1/PRF$
- [0043] Pressure: 초음파의 압력
- [0044] $Intensity = duty * pressure^2 / (2 * c * rho)$: 단위 조사면적 당 조사되는 초음파의 에너지 (c: 물속에서의 음속 = 1500m/s, rho: 물의 밀도 = 1000kg/m³)
- [0046] 일례로, 도 1a에서 주파수가 1MHz인 초음파의 구형파는 1초동안 3회 반복되므로 PRF값은 3Hz가 되고, PRP값은 $1/PRF$ 이므로 0.3333초가 된다. 또한, 도 1b에서 duty percentage는 초음파가 조사되는 한 주기(Ton+Toff) 중에서 실제로 초음파가 조사된 시간(Ton)에 대한 값으로서 $Ton / (Ton + Toff) * 100$ 의 값을 가진다.
- [0047] 참고로, 아래 표 1은 각각의 초음파의 압력 및 duty percentage에 따른 intensity 값을 나타낸다.

표 1

Pressure (MPa)	Intensity (W/m ²)	Intensity with 100% duty (W/cm ²)	Intensity with 1% duty (mW/cm ²)	Intensity with 2% duty (mW/cm ²)	Intensity with 3% duty (mW/cm ²)	Intensity with 5% duty (mW/cm ²)
0.5	83333.3	8.3	83.3	166.7	250.0	416.7
0.7	163333.3	16.3	163.3	326.7	490.0	816.7
1	333333.3	33.3	333.3	666.7	1000.0	1666.7

- [0049] 다음으로, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사하여 세포의 생존율을 증가시키는 방법에 대한 피부 안정성 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0050] 구체적으로 설명하면, 8주령 수컷 래트(rat) 피부에 초음파를 조사하는 동안의 온도 변화 모니터링을 진행한 결과, 30분 동안 피부 온도는 섭씨 약 1.2도 증가하였고, 분당 평균 섭씨 0.05도의 온도 변화량만 나타났다. 즉, 초음파를 조사함으로써 인한 온도 변화의 정도가 피부를 손상시킬 정도에 도달하지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0051] 다음으로, 초음파 조사에 따른 세포 생존을 관찰을 위한 실험 조건에 대해 설명하겠다.

[0052] 참고로, 아래 표 2는 cell seeding density를 나타낸다.

표 2

[0053]	권장 seeding density	5×10^3 cells/cm ²	
	Dish	Surface area(cm ²)	Seeding density
	60mm	21	1.05×10^5 cells
	100mm	55	2.75×10^5 cells
	T75	75	3.75×10^5 cells

[0054] 또한, 아래 표 3은 조건 수에 따른 세포 필요량을 나타낸다.

표 3

[0055]		Passage 9			
		초음파 1well당	10min	Well 수	Cell seeding 수(총 양)
Cell viability assay	96well plate (3*10 ³ cell/well)	조건	22	6.6×10^4	8.4×10^6
		3well	66	1.98×10^5	
	6well plate (8*10 ⁴ cell/well)	조건	20	1.6×10^6	
		3well	60	4.8×10^6	
PCR	6well plate	약물처리조건	22	1.76×10^6	
		초음파처리조건	20	1.6×10^6	
		3well	126	1×10^7	

[0056] 먼저, Material에 대해 설명하면, cell culture는 human hair outer root sheath cells(HHORSC), mesenchymal stem cell medium(MSCM), FBS 0.25% trypsin/EDTA solution, trypsin neutralization solution, dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS), poly-L-lysine, T75 flask로 구성된다.

[0057] 그리고 WST-1 assay에 있어 WST-1 cell proliferation assay system이 이용되며, PCR에 있어 Trizol, sensiFAST probe Hi-ROX one step kit, PrimeTime qPCR assay가 이용된다.

[0058] 우선, culture dish coating(T75 flask 기준)에 있어, Flask에 10ml의 D.W.를 넣은 뒤 15ul의 poly-L-lysine (10mg/ml)을 넣어준다. 그리고, 37도 배양기에 넣어 1시간 동안 coating한다. 그리고 D.W.로 두 번 washing한다.

[0059] 그리고, MSCM 500ml basal medium, 25ml FBS, 5ml의 Mesenchymal stem cell을 이용하여 whole medium을 만든다.

[0060] 그리고, 얼어 있는 cell vial을 37도의 water bath에서 녹이고, 녹인 cell을 배지 3ml에 넣고, 3000rpm에 3분 동안 원심분리하여 cell down 시킨다. 그리고, DPBS를 넣어 washing 후 3000rpm에 3분 원심분리하여 cell down 시켜주며 이 과정을 2번 반복한다. 그리고, Poly-L-lysine으로 coating 된 T75 flask에 배지 8ml을 넣고, cell 펠렛을 풀어준 뒤 seeding하고, 섭씨 37도 5% CO2 배양기에 넣어 배양한다.

[0061] 그리고, cell subculture에 있어, cell이 90%이상 자란 것이 현미경으로 확인되면, DPBS를 3ml 넣어 washing 하고, trypsin/EDTA solution을 3ml 넣은 뒤 37도 배양기에 3분간 배양하고, 세포가 cell flask에서 떨어진 것을 확인한 뒤 배지와 trypsin neutralization solution을 각각 3ml씩 넣어 trypsin/EDTA solution을 중화시키고, 중화된 세포액을 conical tube에 옮긴 뒤 3000rpm에 3분간 원심분리하여 cell down시켜주고, poly-L-lysine으로 coating된 T75 flask에 배지 8ml를 넣고, Cell 펠렛을 풀어준 뒤 seeding하고, 37도 5% CO2 배양기에 넣어 배양한다.

[0062] 그리고, 6 well plate/96 well plate cell seeding에 있어서, poly-L-lysine coating은 plate별로 아래 표 4에 따라 넣은 뒤, culture dish coating 방법대로 진행한다.

표 4

[0063]

면적당 poly L lysine 필요량(ug/cm ²)			2
Dish	Surface area (cm ²)	Poly L lysine 필요량 (ug)	10mg/ml Poly L lysine (ul)
T75	75	150	15
100mm	55	110	11
6well	4.8	9.6	2
12well	3.9	7.8	0.78 (1/10 희석하여 7.8ul)
96well	0.3	0.6	0.06 (1/100 희석하여 6ul)

[0064]

이때, cell subculture에서 cell이 90%이상 자란 것이 현미경으로 확인되면, DBPS를 3ml 넣어 washing 하고, trypsin/EDTA solution을 3ml 넣은 뒤 37도 배양기에 3분간 배양하고, 세포가 cell flask에서 떨어진 것을 확인한 뒤 배지와 trypsin neutralization solution을 각각 3ml씩 넣어 trypsin/EDTA solution을 중화시키고, 중화된 세포액을 conical tube에 옮긴 뒤 3000rpm에 3분간 원심분리하여 cell down시킨 후 트립판 블루와 hemacytometer를 이용하여 cell을 counting 해준다. 그리고 6 well plate에는 8*10⁴만큼, 96 well plate에는 4*10⁴만큼 cell을 seeding해준다.

[0065]

WST assay에 있어, 초음파만을 조사하는 실험의 경우, 6 well plate에 seeding된 cell을 12시간 내지 18시간 배양한 후 현미경으로 확인한다. 그리고 media를 제거한 후 DPBS로 2번 washing해주고, growth factor free media로 바꿔준 뒤 초음파를 cell에 10분간 조사한다. 그리고 37도 5% CO2 배양기에 넣어 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 DPBS로 washing하고 WST-1 약물 0.2ml 처리 후 3시간 incubation하고, 6 well plate에서 1 well 당 96 well plate의 3 well로 상층액을 옮기고, 96 well plate를 흡광도 측정기로 450nm에서 측정한다.

[0066]

WST assay에 있어, 약물만을 적용하는 실험의 경우, 96 well plate에 seeding된 cell을 12시간 내지 18시간 배양한 후 잘 seeding 되었는지 확인한다. 그리고 media를 제거한 후 DPBS로 2번 washing해주고, growth factor free media로 바꿔준 뒤 약물을 cell에 적용한다. 그리고 37도 5% CO2 배양기에 넣어 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 DPBS로 washing하고 WST-1 약물 0.2ml 처리 후 3시간 incubation하고, 96 well plate 흡광도 측정기로 450nm에서 측정한다.

[0067]

한편, 도 3a 및 도 3b는 기존의 약물만을 적용한 경우, 기존의 약물의 적용 농도에 따른 인간 외측모근초 세포 생존율을 개략적으로 도시한 것이다.

[0068]

구체적으로는, 도 3a에서는 탈모 치료 약물인 리텐실을 적용한 경우에 리텐실의 농도에 따른 세포 생존율을 도시하고 있으며, 도 3b에서는 탈모 치료 약물인 미녹시딜을 적용한 경우에 미녹시딜의 농도에 따른 세포 생존율을 도시하고 있다.

[0069]

참고로, 아래 표 5는 약물, 표피 약물 전달체 및 초음파를 함께 적용할 경우에 대한 실험 조건을 나타낸다. 이때, 미녹시딜의 용해도는 PBS에 0.2% 녹으며, 약물을 적용 후 24시간 후에 측정하는 것을 조건으로 한다. 참고로, 해당 부분이 비어있는 이유는, 초음파의 강도가 너무 세서 세포 변형이 발생하기 때문에 초음파만 조사하는 대조군을 설정하지 않은 것이다.

표 5

[0070]

Control	96well plate			6well plate		
	Positive control (EGF)	미녹시딜	리텐실	초음파 + 표피 약물 전달체 + 리텐실		
				초음파	미소기포	리텐실

Medium	50ng /100ul	0.00002%	0.01%	0.3MPa 1%	0.5MPa	2%	1:1000	0.04%
								0.1%
								0.2%
		0.0002%	0.02%					0.5%
								1%
		0.002%	0.04%					2%
								3%
		0.005%	0.1%	0.5MPa 2%	0.5MPa	5%		0.04%
								0.1%
								0.2%
		0.01%	0.2%					0.5%
								1%
		0.02%	0.5%					2%
								3%
		0.05%	1%	1MPa 2%	1MPa	1%		0.04%
								0.1%
								0.2%
		0.15%	2%					0.5%
								1%
		0.2%	3%					2%
								3%
			4%		1MPa	3%		0.04%
								0.1%
								0.2%
			5%					0.5%
								1%
			10%					2%
								3%

[0071] 다음으로, 도 4는 표피 약물 전달체를 개략적으로 도시한 것이다.

[0072] 일례로, 표피 약물 전달체는 도 4에 도시된 것과 같이 단일막으로 구성될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 외막과 내막 등 복수의 막으로 이루어지거나 막 내부에 약물을 포함하는 구조일 수 있다.

[0073] 한편, 세포 실험에 있어, MTT와 WST-1 비교 실험을 수행하였으며, MTT의 경우 Redensyl의 흡광도 범위와 MTT의 흡광도 범위가 서로 겹쳐서 데이터의 정확도가 떨어지는 문제가 있었다. 반면에, WST-1의 경우 Redensyl의 흡광도 범위와 WST-1의 흡광도 범위가 겹치지 않았기에, WST-1을 사용하여 실험을 진행하였다.

[0074] 또한, Media 비교 실험을 수행하였는데, 제1 실험에서는 seeding 안정화 후 complete media에 Redensyl 처리하여 24시간 관찰하였다. 다만, 시간은 24시간에 한정되는 것은 아니며 세포 상태에 따라 시간 변경이 가능할 수 있다. 또한 제2 실험에서는 seeding 안정화 후 growth factor를 포함하지 않은 media에 Redensyl 처리하여 24시간 관찰하였다. 제2 실험도 제1 실험과 마찬가지로, 세포 상태에 따라 시간 변경이 가능할 수 있다.

[0075] 제1 실험 및 제2 실험을 한 결과, growth factor를 포함하지 않은 media로 진행하였을 때 초음파의 효과를 더 잘 관찰할 수 있었다. 따라서, growth factor를 포함하지 않은 media에 Redensyl 처리하여 실험을 진행하였다.

[0076] 이후 초음파 조사 실험을 진행하였는데, 초음파 처리를 전후하여 Assay를 통해 정량 분석하였다.

[0077] 표 6 내지 표 9는 세포에 대한 초음파의 물리적 영향을 평가하기 위한 초음파 조사 실험 조건을 나타낸다.

[0078] 구체적으로, 표 6 및 표 7은 seeding후 안정화 과정 중 serum free media, overnight, complete media에 Redensyl 처리하여 관찰하는 조건을 나타낸다.

표 6

[0079]

96Well-1	A	B	C	D	E	F	G	H
1	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT
2	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT

3	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT
4	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT
5	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T
6	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT
7	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST
8	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST
9	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST
10	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST
11	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T
12	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST

표 7

[0080]

96Well-2	A	B	C	D	E	F	G	H
1	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT
2	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT
3	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT
4	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT
5	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T
6	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT
7	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST
8	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST
9	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST
10	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST
11	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T
12	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST

[0081]

또한, 표 8 및 표 9는 seeding하여 안정화한 후 serum free media에 Redensyl 처리하여 관찰하는 조건을 나타낸다.

표 8

[0082]

96Well-3	A	B	C	D	E	F	G	H
1	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT	M-24-XTT
2	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT	P-24-XTT
3	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT	R0.01-24-X TT
4	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT	R0.04-24-X TT
5	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T	R0.2-24-XT T
6	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT	R1-24-XTT
7	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST	M-24-WST
8	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST	P-24-WST
9	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST	R0.01-24-W ST
10	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST	R0.04-24-W ST

11	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T	R0.2-24-WS T
12	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST	R1-24-WST

표 9

[0083]

96Well-4	A	B	C	D	E	F	G	H
1	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT	M-48-XTT
2	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT	P-48-XTT
3	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT	R0.01-48-X TT
4	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT	R0.04-48-X TT
5	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T	R0.2-48-XT T
6	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT	R1-48-XTT
7	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST	M-48-WST
8	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST	P-48-WST
9	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST	R0.01-48-W ST
10	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST	R0.04-48-W ST
11	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T	R0.2-48-WS T
12	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST	R1-48-WST

[0084]

또한, 표 10은 초음파의 압력 및 duty percentage를 달리하며 초음파를 조사하는 실험 조건을 나타낸다.

표 10

[0085]

6Well-1	1	2	3
A	1MPa, 3%	1MPa, 2%	1MPa, 1%
B	0.5MPa, 3%	0.5MPa, 2%	0.5MPa, 1%
6Well-2	1	2	3
A	1MPa, 3%	1MPa, 2%	1MPa, 1%
B	0.5MPa, 3%	0.5MPa, 2%	0.5MPa, 1%
6Well-3	1	2	3
A	1MPa, 3%	1MPa, 2%	1MPa, 1%
B	0.5MPa, 3%	0.5MPa, 2%	0.5MPa, 1%
6Well-4	1	2	3
A	Control	Control	control
B	1.5MPa, 10%	1.5MPa, 5%	
6Well-5	1	2	3
A			
B			
6Well-6	1	2	3
A			
B			

[0086]

표 10을 참조하면, 초음파의 압력(0.5MPa, 1MPa, 1.5MPa) 및 duty percentage(1%, 2%, 3%)를 달리하면서, 초음파를 세포에 10분 동안 조사하는 실험을 수행하였다.

[0087]

구체적으로, well 1번 내지 3번에서는, 초음파의 압력을 0.5MPa 또는 1MPa, 초음파의 duty percentage를 1% 내지 3%로 하여 초음파를 조사하였다.

[0088]

다만 well 4번에서는 다른 압력 및 duty percentage에 의한 결과와 비교를 위해 압력(1.5MPa) 및 duty percentage(5%, 10%)를 높게 하여 세포의 사멸을 유도하였다.

- [0089] 이에 따른 결과들은 도 5 내지 도 21과 같다.
- [0090] 우선, 도 5는 초음파가 조사되지 않은 인간 외측모근초 세포에 대해 특정 시점의 생존율 및 특정 시점으로부터 12시간 이후의 생존율 결과를 개략적으로 도시한 것으로서, 초음파가 조사된 군과의 비교를 위한 대조군을 의미한다.
- [0091] 도 5를 참조하면, 초음파가 조사되지 않은 경우, 왼쪽 도면이 나타내는 특정 시점의 생존율과 비교하여 오른쪽 도면이 나타내는 특정 시점으로부터 12시간 이후의 세포 생존율에 별다른 변화는 관찰되지 않는다.
- [0092] 도 6은 초음파(압력: 0.5MPa, duty percentage: 1%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0093] 도 7은 초음파(압력: 0.5MPa, duty percentage: 1%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0094] 도 6 및 도 7을 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 0.5MPa, duty: 1%)를 조사 후 12시간이 경과한 경우 세포 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0095] 도 8은 초음파(압력: 0.5MPa, duty percentage: 2%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0096] 도 9는 초음파(압력: 0.5MPa, duty percentage: 2%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0097] 도 8 및 도 9를 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 0.5MPa, duty: 2%)를 조사 후 12시간이 경과한 경우 세포 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0098] 도 10은 초음파(압력: 0.5MPa, duty percentage: 3%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0099] 도 11은 초음파(압력: 0.5MPa, duty percentage: 3%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0100] 도 10 및 도 11을 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 0.5MPa, duty: 3%)를 조사 후 12시간이 경과한 경우 세포 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0101] 도 12는 초음파(압력: 1MPa, duty percentage: 1%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0102] 도 13은 초음파(압력: 1MPa, duty percentage: 1%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0103] 도 12 및 도 13을 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 1MPa, duty: 1%)를 조사 후 12시간이 경과한 경우 세포 생존율이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0104] 도 14는 초음파(압력: 1MPa, duty percentage: 2%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0105] 도 15는 초음파(압력: 1MPa, duty percentage: 2%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0106] 도 14 및 도 15를 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 1MPa, duty: 2%)를 조사 후 12시간이 경과한 경우 세포가 터져 나가거나 변형이 오는 등 세포 생존율이 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [0107] 도 16은 초음파(압력: 1MPa, duty percentage: 3%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0108] 도 17은 초음파(압력: 1MPa, duty percentage: 3%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0109] 도 16 및 도 17을 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 1MPa, duty: 3%)를 조사한 직후 및 조사 후 12시간이 경과한 경우 세포가 터져 나가거나 변형이 오는 등 세포 생존율이 감소한 것을 확인

할 수 있다.

- [0110] 도 18은 초음파(압력: 1.5MPa, duty percentage: 5%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0111] 도 19는 초음파(압력: 1.5MPa, duty percentage: 5%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0112] 도 18 및 도 19를 참조하면, 12시간 후의 control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 1.5MPa, duty: 5%)를 조사한 직후 및 조사 후 12시간이 경과한 경우 높은 비율로 세포가 터져 나가거나 변형이 오는 등 세포 생존율이 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [0113] 도 20은 초음파(압력: 1.5MPa, duty percentage: 10%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한 직후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0114] 도 21은 초음파(압력: 1.5MPa, duty percentage: 10%)를 인간 외측모근초 세포에 조사한지 12시간 후의 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0115] 도 20 및 도 21을 참조하면, control군 결과와 비교할 때 초음파(압력: 1.5MPa, duty: 10%)를 조사한 직후 및 조사 후 12시간이 경과한 경우 대부분의 세포가 터져 나가거나 변형이 오는 등 세포 생존율이 감소한 것을 확인할 수 있다.
- [0116] 이처럼 도 6 내지 도 21을 통해, 압력 1MPa 이하, duty 5%이하, intensity 416.7 mW/cm^2 이하의 에너지는 세포에 안전한 것으로 확인되었다. 또한, 압력을 1.5MPa 이상으로 설정하였을 때 세포가 터져 나가거나 변형이 오는 것이 관찰되었다. 또한, 안전한 에너지 범위대의 초음파를 조사할 경우 대조군에 비해 세포의 growth가 증가되는 것이 관찰되었다.
- [0117] 일례로, 초음파를 조사하여 세포의 생존율(viability)을 증가시키는 방법에 있어서, 대상체의 표피에 약물 및 표피 약물 전달체가 적용되고, 초음파 파라미터들 각각이 소정의 범위로 기설정된 상태에서, 초음파 조사 장치가, 초음파 발생부를 상기 대상체의 표피로부터 임계 범위 내에 위치시킴으로써 상기 대상체의 표피에 초음파를 조사하되, 상기 표피 약물 전달체는 상기 초음파가 조사되면 상기 대상체의 표피 주위에 공동(cavity)을 생성하는 공동화(cavitation)를 유발하고, 상기 초음파 파라미터들에는 적어도 초음파의 압력 및 초음파의 duty percentage가 포함되고, 상기 초음파의 압력은 0.5MPa 내지 1MPa이고, 상기 초음파의 duty percentage는 1% 내지 5%일 수 있다.
- [0118] 또한, 초음파의 파라미터들에는 초음파의 강도가 더 포함될 수 있으며, 초음파의 강도는 166.7 mW/cm^2 내지 416.7 mW/cm^2 일 수 있다.
- [0119] 또한, 초음파의 파라미터들에는 초음파의 전체 조사 시간이 더 포함될 수 있으며, 초음파의 전체 조사 시간은 10분일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 10분 이내의 조사 시간일 수도 있으며, 10분을 초과할 수도 있다.
- [0120] 또한, 초음파 발생부는 대상체의 표피에 접촉한 상태이거나, 대상체의 표피로부터 소정의 거리를 두고 이격된 상태에서 대상체의 표피에 초음파를 조사할 수 있다. 또한, 초음파 발생부는 헬멧 또는 헤드 기어 형태로 대상체의 표피를 감싸는 형상일 수 있다.
- [0121] 한편, 초음파의 파라미터들에는 초음파의 주파수가 더 포함될 수 있으며, 초음파의 주파수는 0.5MHz 내지 4.6MHz일 수 있다.
- [0122] 일례로, 초음파의 주파수는 1MHz일 수 있다.
- [0123] 한편, 약물은 리덴실(Redensyl)일 수 있으며, 리덴실의 농도는 0.5% 내지 1%일 수 있다.
- [0124] 또한, 세포는 외측모근초(outer root sheath) 세포일 수 있다.
- [0125] 도 22 내지 도 25는 (i) 다양한 농도의 약물만을 적용하여 도출된 인간 외측모근초 세포 생존율 실험결과와 (ii) 다양한 농도의 약물, 표피 약물 전달체 및 초음파를 함께 적용하여 도출된 인간 외측모근초 세포 생존율 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0126] 일례로, 도 22에서 확인할 수 있듯이, 동일한 intensity(0.5MPa, 2%)의 초음파를 적용하는 조건이라면, 약물의

농도가 0.5% 내지 1%일 때 가장 높은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0127] 또한, 적정한 강도의 초음파, 가령 0.5MPa 및 2%의 강도를 가지는 초음파를 약물(0.5% 내지 1% 농도) 및 표피 약물 전달체와 함께 적용하는 경우, 동일한 농도의 약물만을 적용한 결과와 비교하여 월등하게 높은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0128] 한편, 도 22를 참조하여 설명한 내용은 도 23 및 도 24에서도 마찬가지로 적용되므로 자세한 설명을 생략한다.

[0129] 또한, 도 22 내지 도 24와 같이 초음파의 intensity가 166.7 mW/cm^2 (0.5MPa, 2%), 333.4 mW/cm^2 (1MPa, 1%) 416.7 mW/cm^2 (0.5MPa, 5%)일 때의 세포의 생존율이 그 외의 초음파 intensity 범위, 가령, 도 25와 같이 초음파의 압력이 1MPa이고 3%의 duty percentage일 때의 세포의 생존율에 비해 월등하게 높은 것을 확인할 수 있다.

[0130] 참고로, 표 11 내지 표 14는 각각 도 22 내지 도 25에 도시된 실험결과를 나타내는 표로서, 아래와 같다.

표 11

[0131]

		av	sd
	Control	100%	0.00
	0.5MPa2%	124%	0.03
약물 단독 처리	리텐실 0.04%	113%	0.02
	리텐실 0.1%	114%	0.01
	리텐실 0.2%	118%	0.04
	리텐실 0.5%	119%	0.04
	리텐실 1%	123%	0.01
	리텐실 2%	125%	0.01
	리텐실 3%	132%	0.01
초음파 0.5MPa 2% + 표피 약물 전달 체 + 약물 처리	리텐실 0.04%	117%	0.04
	리텐실 0.1%	121%	0.05
	리텐실 0.2%	112%	0.03
	리텐실 0.5%	144%	0.06
	리텐실 1%	144%	0.02
	리텐실 2%	128%	0.02
	리텐실 3%	106%	0.07

표 12

[0132]

		av	sd
	Control	100%	0.00
	0.5MPa5%	125%	0.01
약물 단독 처리	리텐실 0.04%	113%	0.02
	리텐실 0.1%	114%	0.01
	리텐실 0.2%	118%	0.04
	리텐실 0.5%	119%	0.04
	리텐실 1%	123%	0.01
	리텐실 2%	125%	0.01
	리텐실 3%	132%	0.01
초음파 0.5MPa 5% + 표피 약물 전달 체 + 약물 처리	리텐실 0.04%	127%	0.03
	리텐실 0.1%	127%	0.04
	리텐실 0.2%	128%	0.09
	리텐실 0.5%	148%	0.04
	리텐실 1%	125%	0.03
	리텐실 2%	99%	0.05
	리텐실 3%	88%	0.01

표 13

[0133]

		av	sd
	Control	100%	0.00
	1MPa1%	118%	0.02
약물 단독 처리	리텐실 0.04%	113%	0.02
	리텐실 0.1%	114%	0.01
	리텐실 0.2%	118%	0.04
	리텐실 0.5%	119%	0.04
	리텐실 1%	123%	0.01
	리텐실 2%	125%	0.01
	리텐실 3%	132%	0.01
초음파 1MPa 1% + 표피 약물 전달 체 + 약물 처리	리텐실 0.04%	97%	0.02
	리텐실 0.1%	107%	0.01
	리텐실 0.2%	110%	0.02
	리텐실 0.5%	143%	0.17
	리텐실 1%	134%	0.01
	리텐실 2%	114%	0.03
	리텐실 3%	104%	0.00

표 14

[0134]

		av	sd
	Control	100%	0.00
	1MPa3%	32%	0.05
약물 단독 처리	리텐실 0.04%	113%	0.02
	리텐실 0.1%	114%	0.01
	리텐실 0.2%	118%	0.04
	리텐실 0.5%	119%	0.04
	리텐실 1%	123%	0.01
	리텐실 2%	125%	0.01
	리텐실 3%	132%	0.01
초음파 1MPa 3% + 표피 약물 전달 체 + 약물 처리	리텐실 0.04%	24%	0.01
	리텐실 0.1%	20%	0.02
	리텐실 0.2%	20%	0.00
	리텐실 0.5%	17%	0.02
	리텐실 1%	25%	0.02
	리텐실 2%	13%	0.01
	리텐실 3%	6%	0.01

[0135]

한편, 도 26 내지 도 37은 본 발명의 일 실시예에 따른 초음파를 조사한 경우에 유전자 발현에 관한 실험결과를 개략적으로 도시한 것이다.

[0136]

구체적으로, 도 26 내지 도 37은 대상체의 표피에 약물을 적용하고, 1MHz의 주파수를 가지는 초음파를 조사하였을 때, WNT10B, Beta Catenin, Keratin 15, VDR, PCNA, Ki67 및 BCL2 관련 유전자 발현 결과를 개략적으로 도시한 것이다.

[0137]

일례로, 도 26 내지 도 29를 참조하면, 초음파의 강도를 166.7 mW/cm^2 (0.5MPa, 2%)로 설정하고 초음파의 주파수를 1MHz로 설정하고, 리텐실의 농도를 0.5% 내지 1%로 하였을 때, WNT10B, Beta Catenin, Keratin 15, VDR, PCNA, Ki67 및 BCL2 관련 유전자 발현 정도가 다른 범위에서의 유전자 발현 정도에 비해 월등히 높은 것을 확인할 수 있다.

[0138]

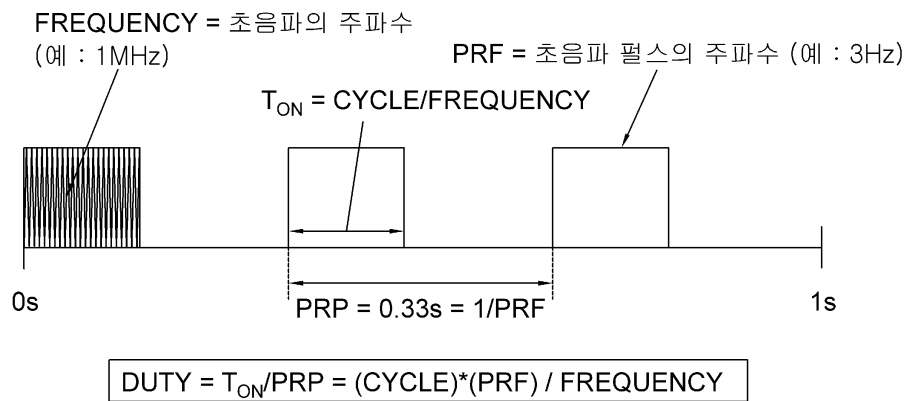
도 30 내지 도 33은 초음파의 강도를 416.7 mW/cm^2 (0.5MPa, 5%)로 설정하고 초음파의 주파수를 1MHz로 설정한 경우로서, 도 26 내지 도 29를 참조하여 설명한 것과 마찬가지로, 리텐실의 농도가 0.5% 내지 1%인 구간에서 WNT10B, Beta Catenin, Keratin 15, VDR, PCNA, Ki67 및 BCL2 관련 유전자 발현 정도가 다른 범위에서의 유전

자 발현 정도에 비해 월등히 높은 것을 확인할 수 있다.

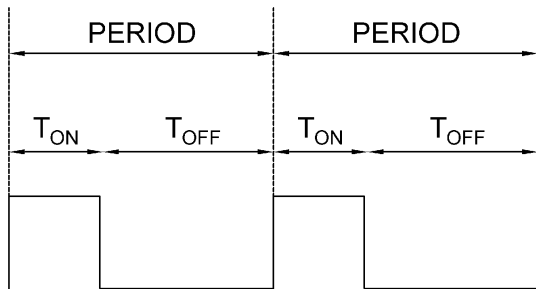
- [0139] 도 34 내지 도 37은 초음파의 강도를 333.4 mW/cm^2 (1MPa, 1%)로 설정하고 초음파의 주파수를 1MHz로 설정한 경우로서, 도 26 내지 도 29를 참조하여 설명한 것과 마찬가지로, 리텐실의 농도가 0.5% 내지 1%인 구간에서 WNT10B, Beta Catenin, Keratin 15, VDR, PCNA, Ki67 및 BCL2 관련 유전자 발현 정도가 다른 범위에서의 유전자 발현 정도에 비해 월등히 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0140] 한편, 도 38 및 도 39는 본 발명의 일 실시예에 따라 1MHz의 주파수를 가지는 초음파를 조사하였을 때의 DNA methylation 정도를 개략적으로 도시한 것이다.
- [0141] 도 38 및 도 39를 통해 확인할 수 있는 것처럼, 1MHz의 주파수, 166.7 mW/cm^2 내지 416.7 mW/cm^2 의 intensity를 가지는 초음파를 0.5% 내지 1%의 농도를 가지는 약물 및 표피 약물 전달체와 함께 적용하였을 때, unmethylated DNA Ct값이 크게 낮아진 것을 확인할 수 있다.
- [0142] 한편, 초음파 파라미터들에는 PRF 또는 PRP가 더 포함될 수 있으며, PRF는 1Hz 내지 100Hz이고 PRP는 0.01초 내지 1초일 수 있다.
- [0143] 한편, 도 42는 표피 약물 전달체, 약물 및 초음파를 함께 적용하되, 주 2회씩 회당 10분간 적용한 경우 기간의 경과에 따른 자체 임상 결과를 나타낸다.
- [0144] 도 43a는 어떠한 방법도 적용되지 않은 상태를 나타내고, 도 43b는 종래 기술을 12개월간 적용한 결과를 나타내고, 도 43c 및 도 43d는 표피 약물 전달체, 약물 및 초음파를 함께 적용한 경우 시간의 경과에 따른 결과를 나타낸다.
- [0145] 도 43a와 비교하여 도 43b에서도 개선된 결과를 확인할 수 있지만, 도 43b는 도 43c 및 도 43d와 비교할 때, 적용기간에 있어 매우 큰 차이가 존재함을 알 수 있다. 즉, 본 발명에 의할 경우 종래 기술의 적용 기간(도 43b의 경우 12개월)에 비해 획기적으로 짧은 기간(도 43c 및 도 43d의 경우 2개월 내지 4개월) 내에 종래 기술의 효과와 동일하거나 종래 기술의 효과보다 우월한 효과를 얻을 수 있게 된다.
- [0146] 도 44a 및 도 44b는 표피 약물 전달체, 약물 및 초음파를 함께 6개월간 적용한 결과를 나타낸 것이다.
- [0147] 육안으로도 모발의 개수 등에 있어 적용 전과 적용 후의 차이를 확인할 수 있다.
- [0148] 이상에서 본 발명이 구체적인 구성요소 등과 같은 특정 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명이 상기 실시예들에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적인 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형을 꾀할 수 있다.
- [0149] 따라서, 본 발명의 사상은 상기 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등하게 또는 등가적으로 변형된 모든 것들은 본 발명의 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

도면1a



도면1b



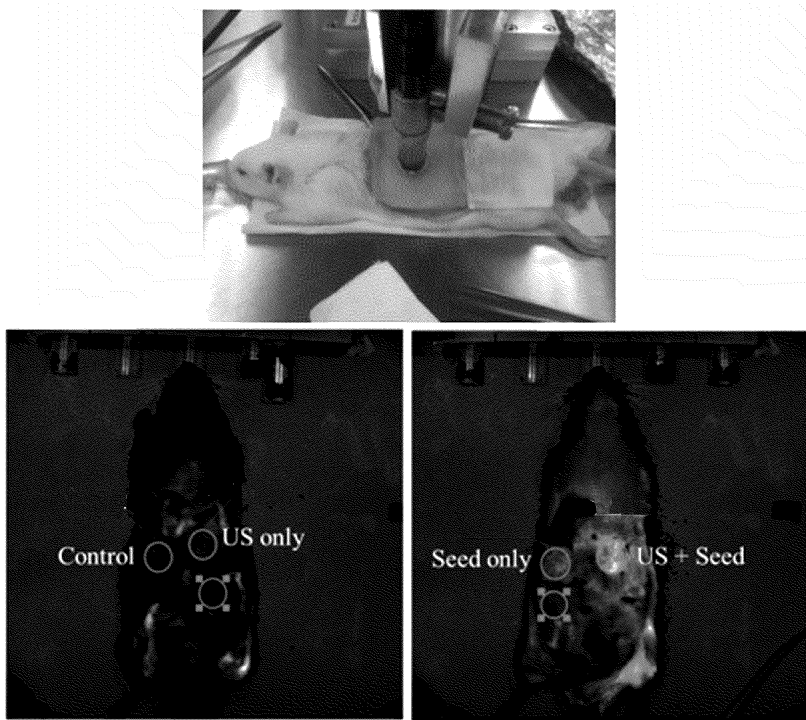
$$\text{PERIOD} = 1 / \text{FREQUENCY}$$

$$\text{PERIOD} = T_{ON} + T_{OFF}$$

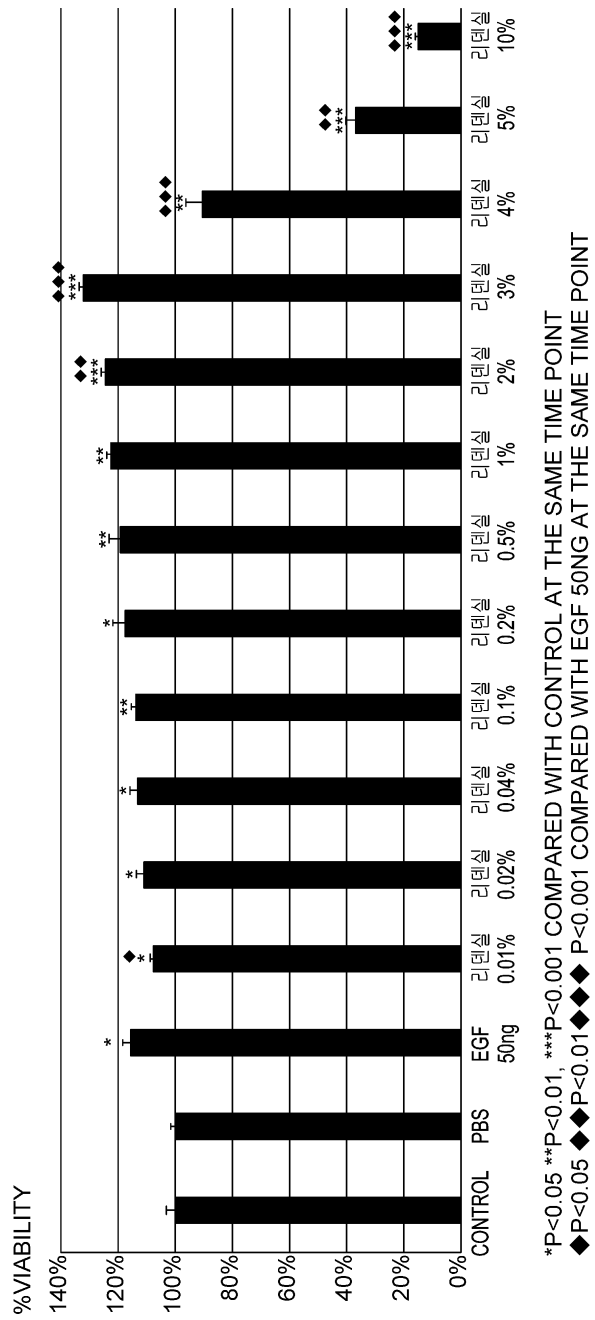
$$\text{DUTY CYCLE} = T_{ON} / (T_{ON} + T_{OFF}) * 100$$

(ON PERCENTAGE)

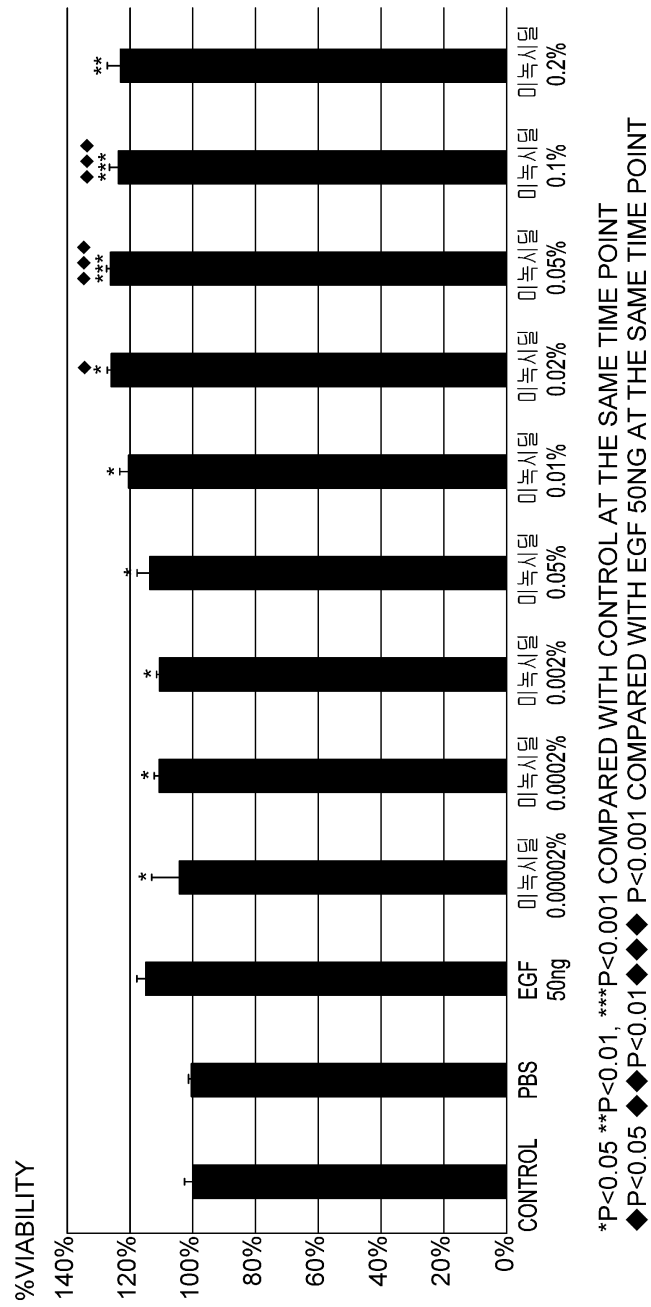
도면2



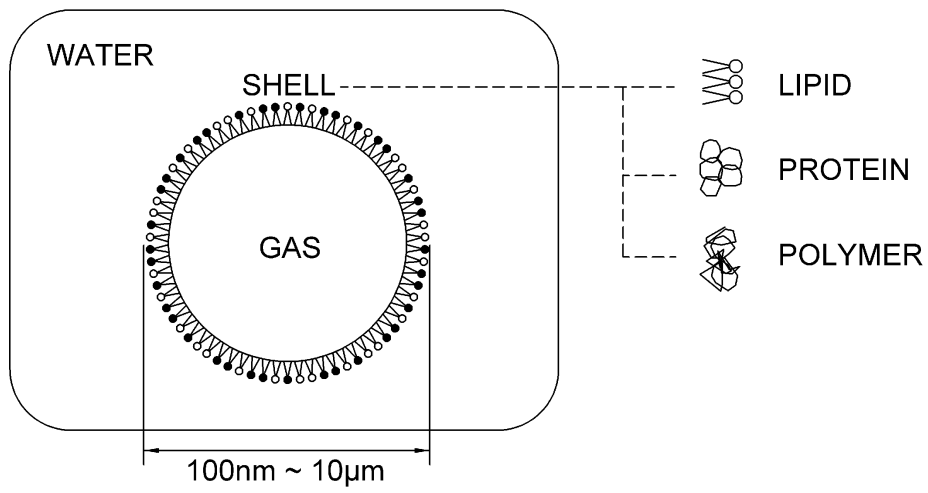
도면3a



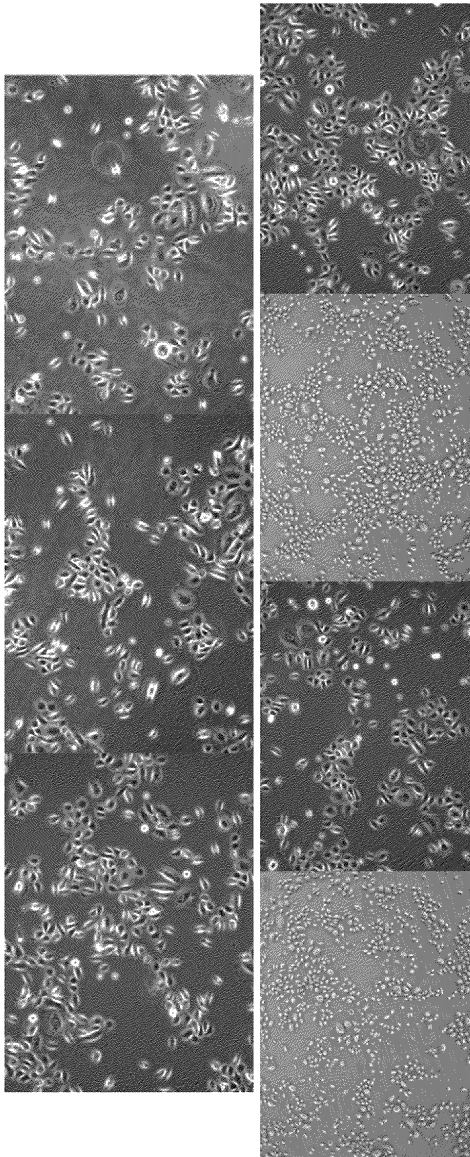
도면3b



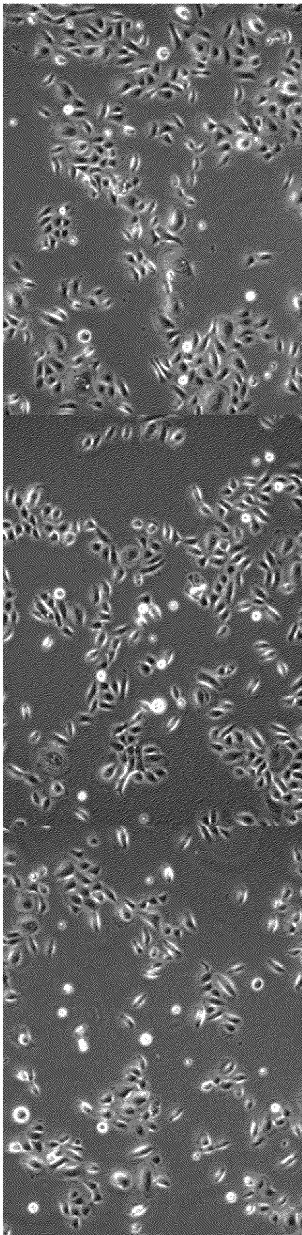
도면4



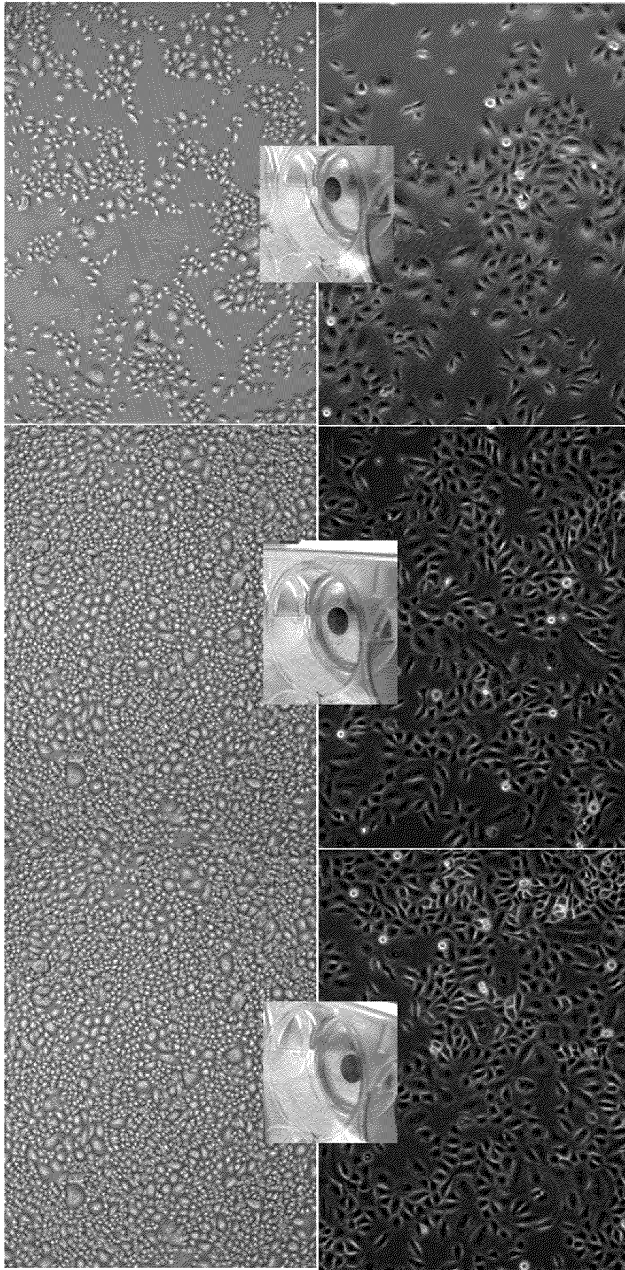
도면5



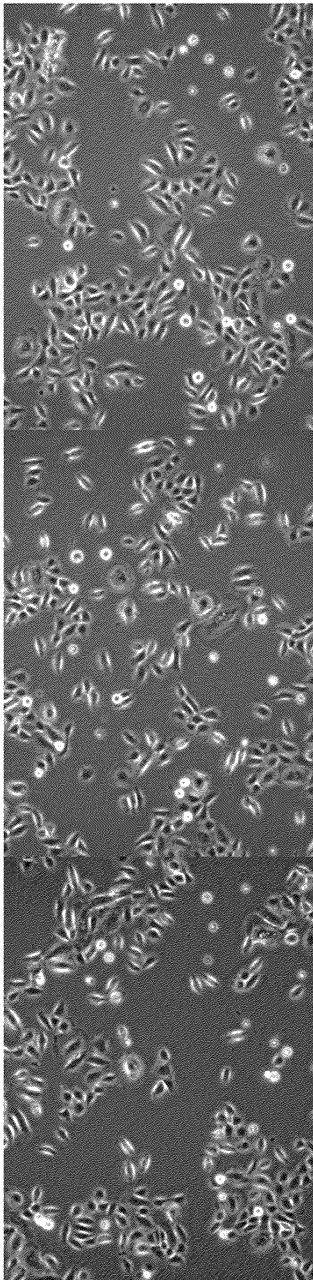
도면6



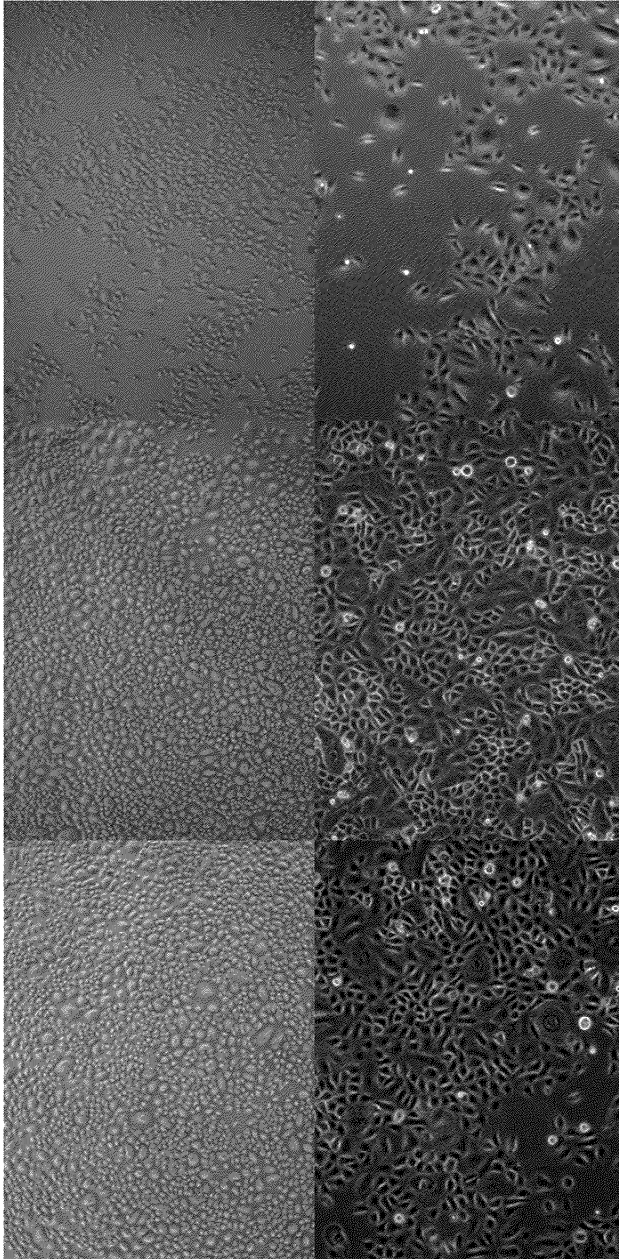
도면7



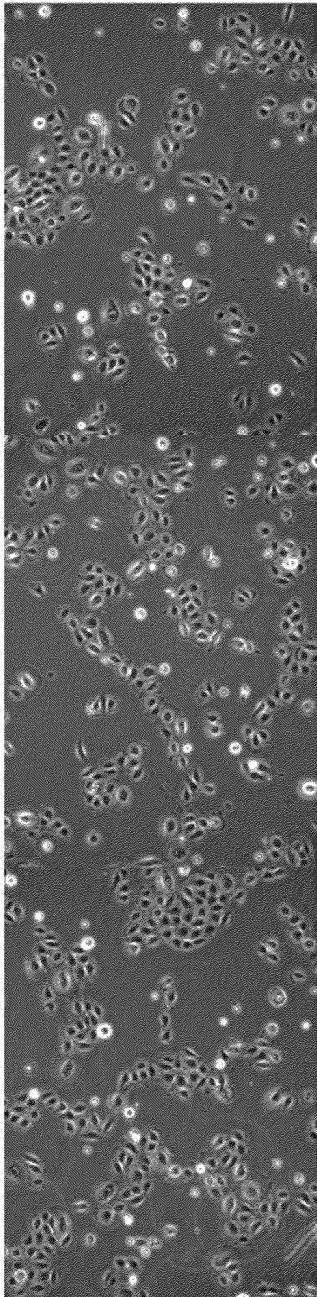
도면8



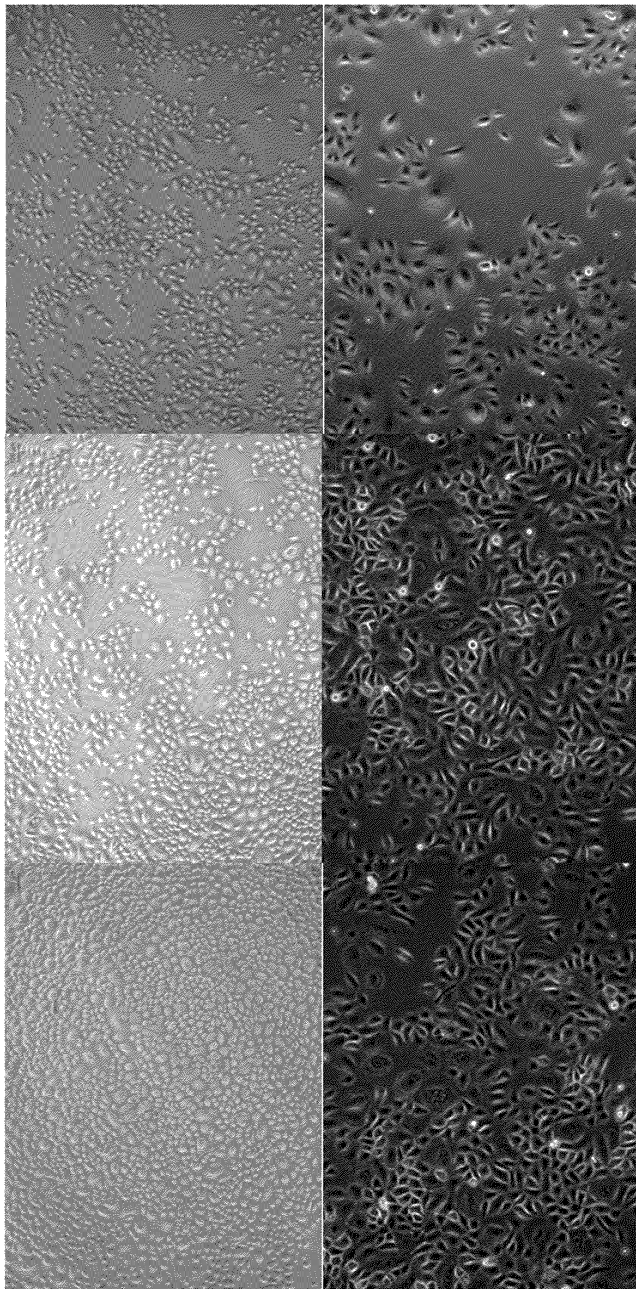
도면9



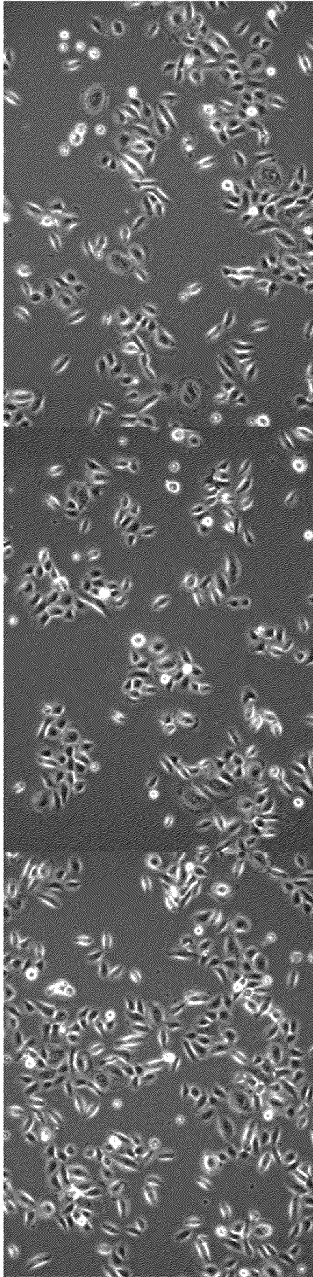
도면10



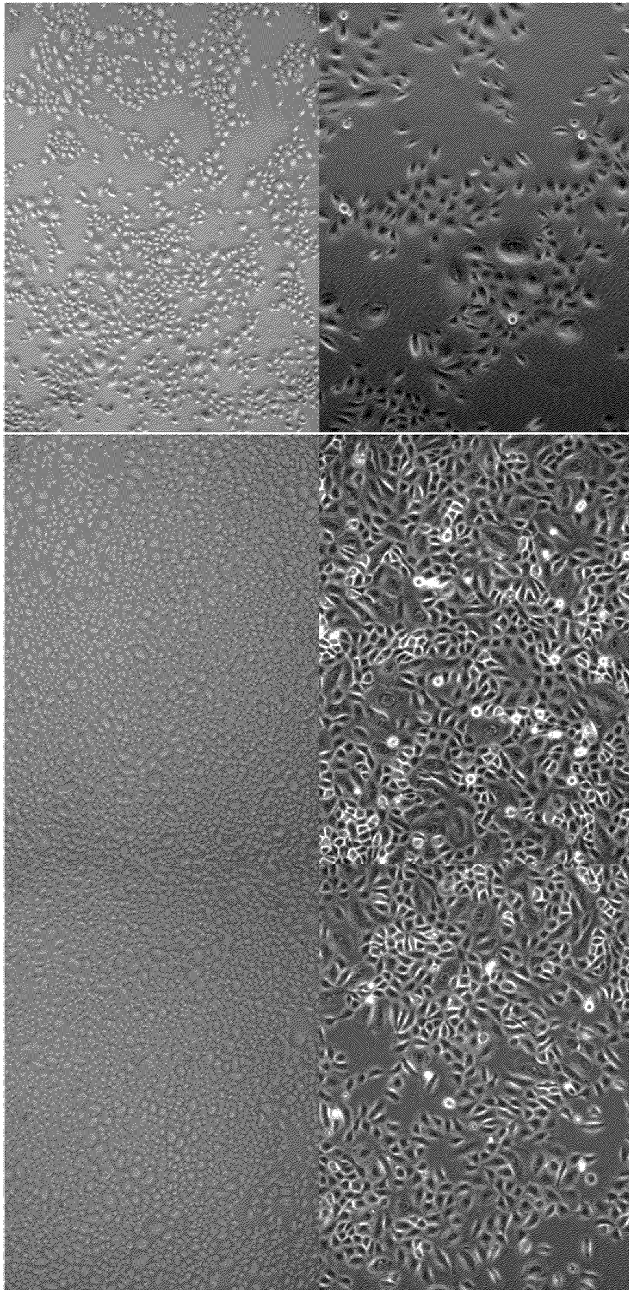
도면11



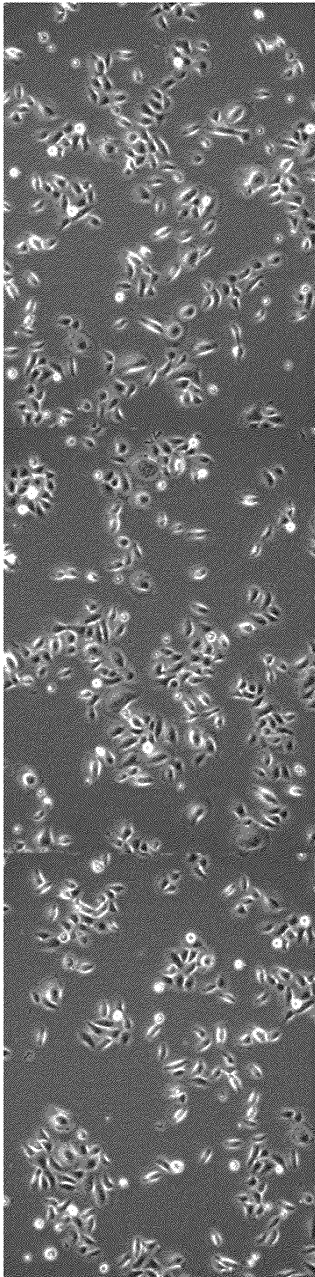
도면12



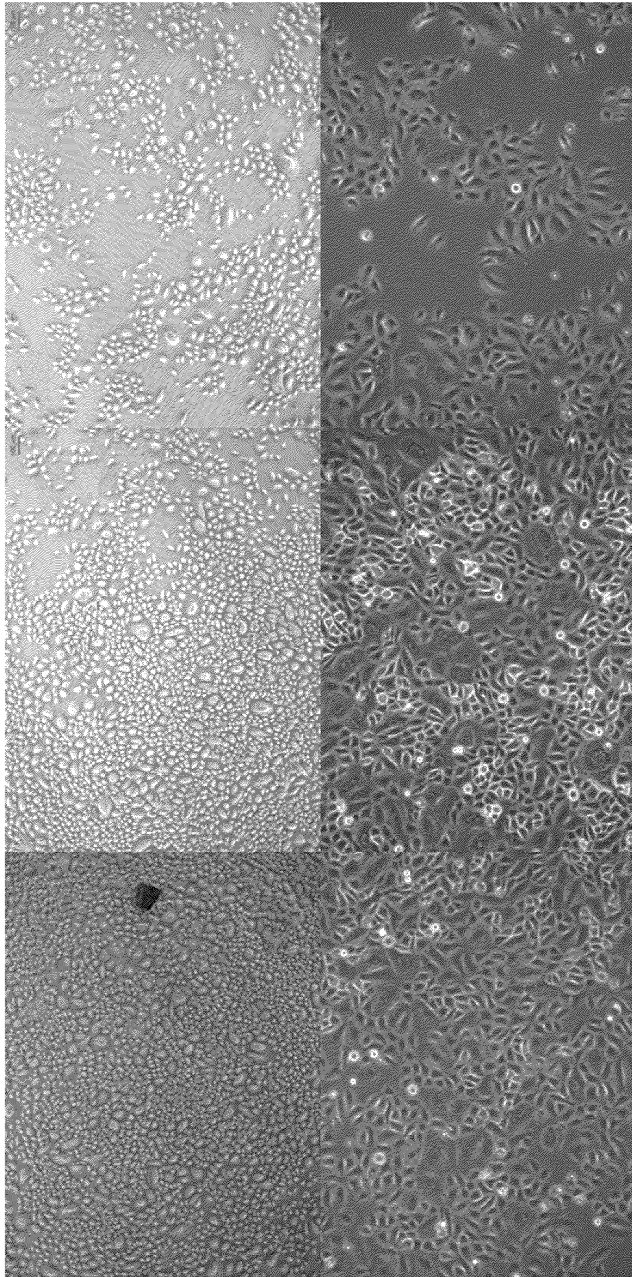
도면13



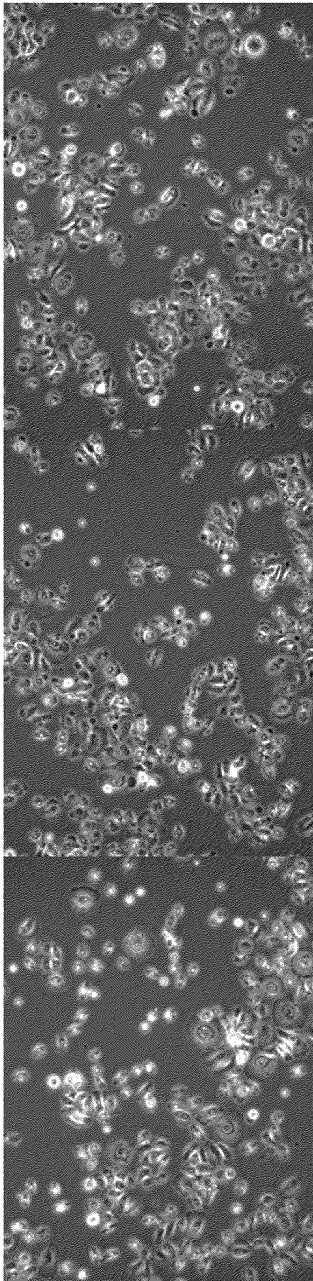
도면14



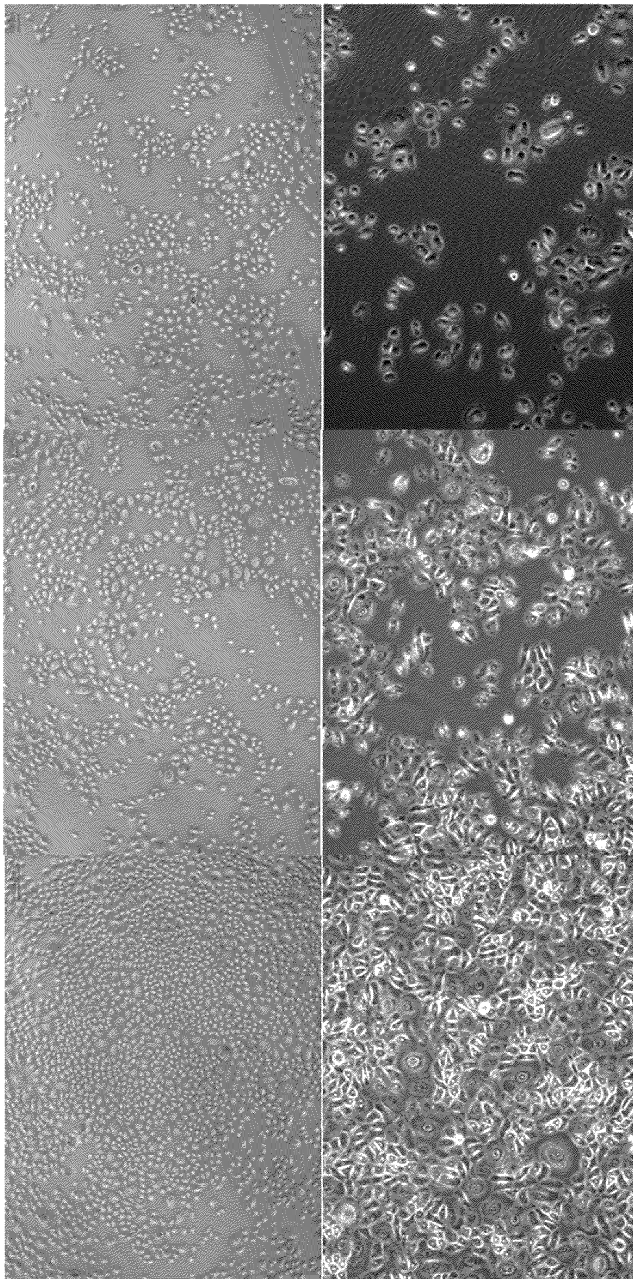
도면15



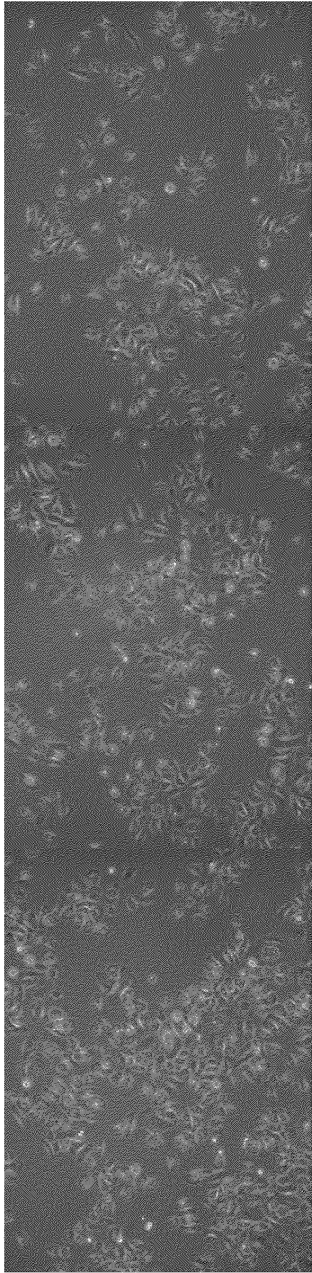
도면16



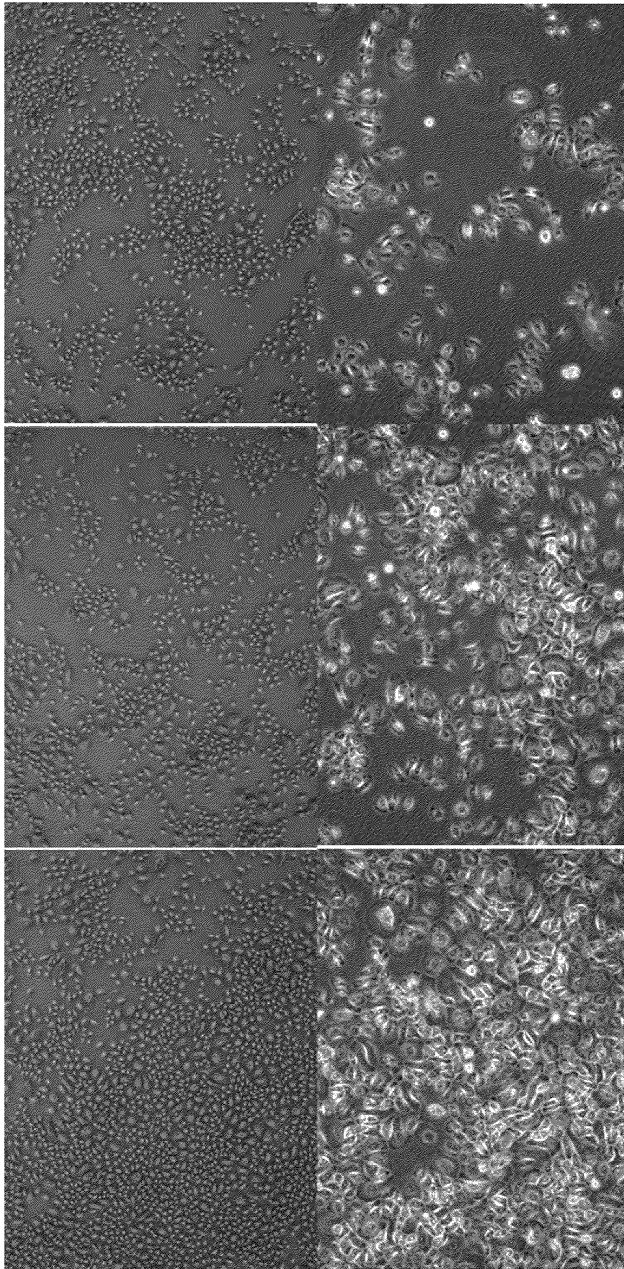
도면17



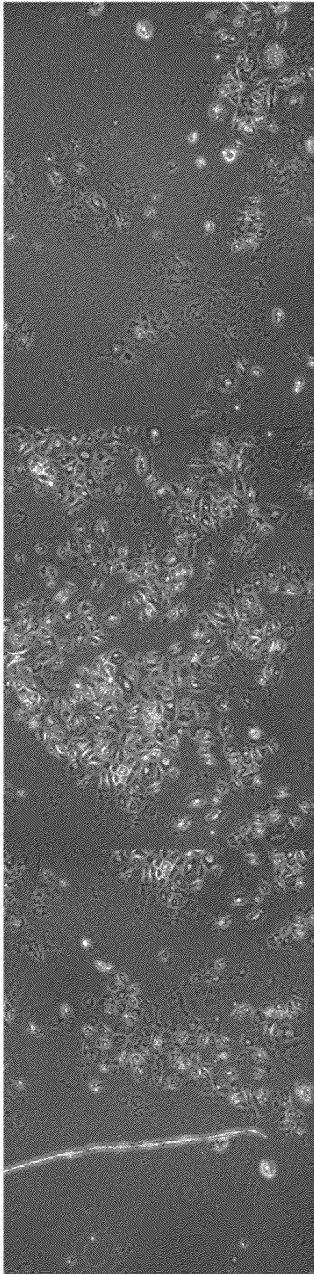
도면18



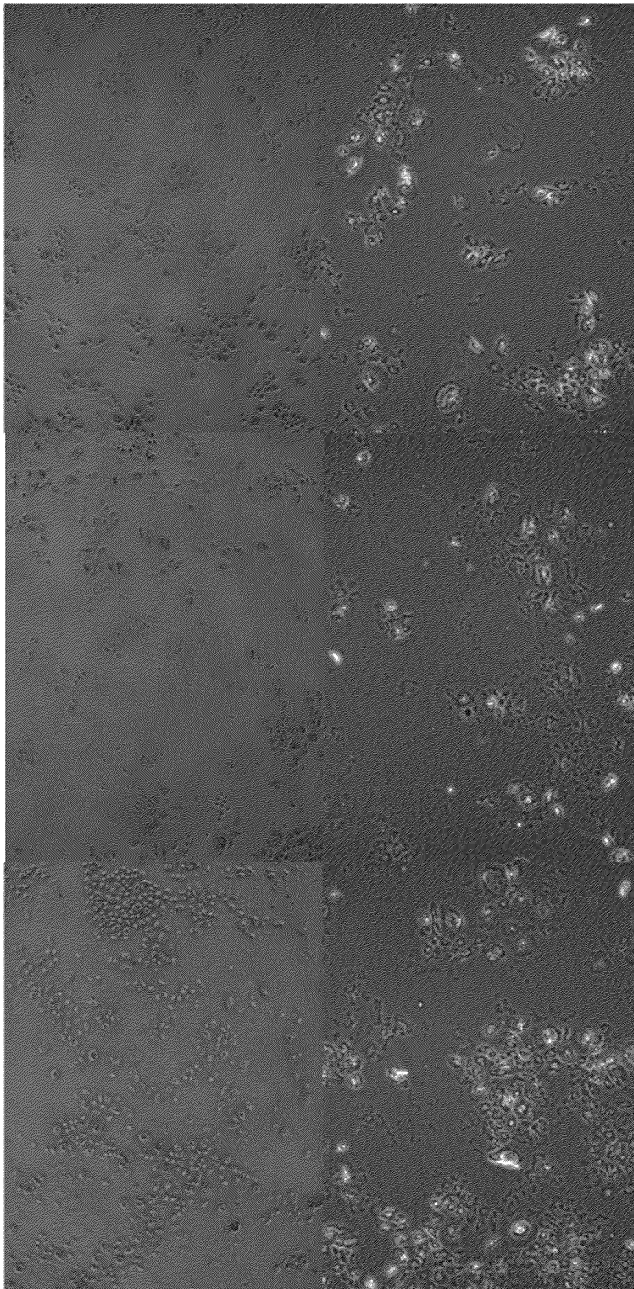
도면19



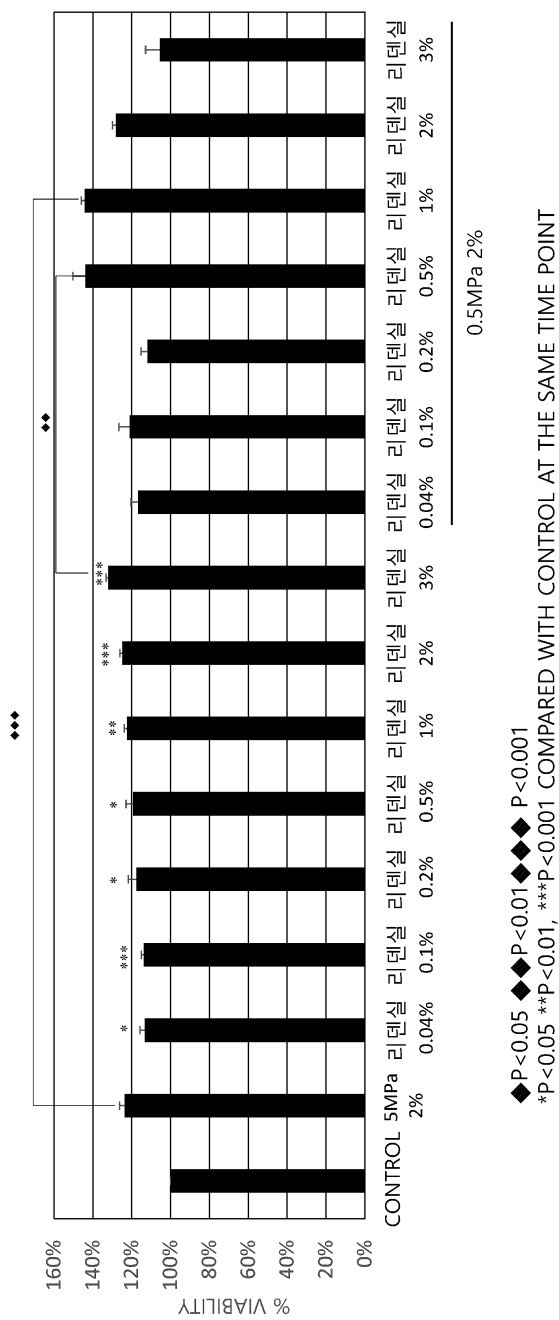
도면20



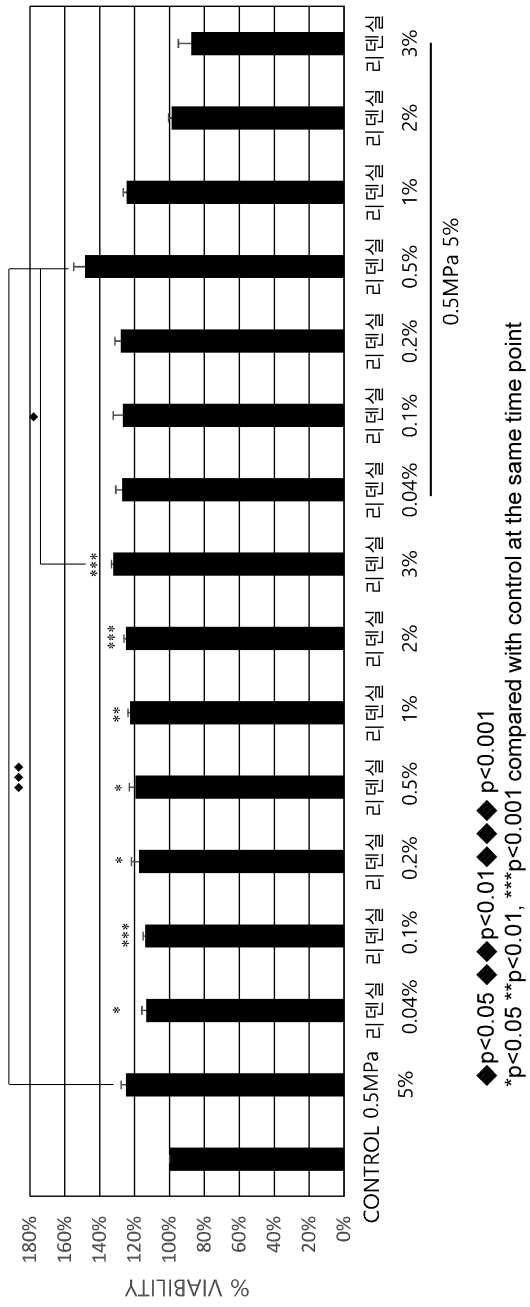
도면21



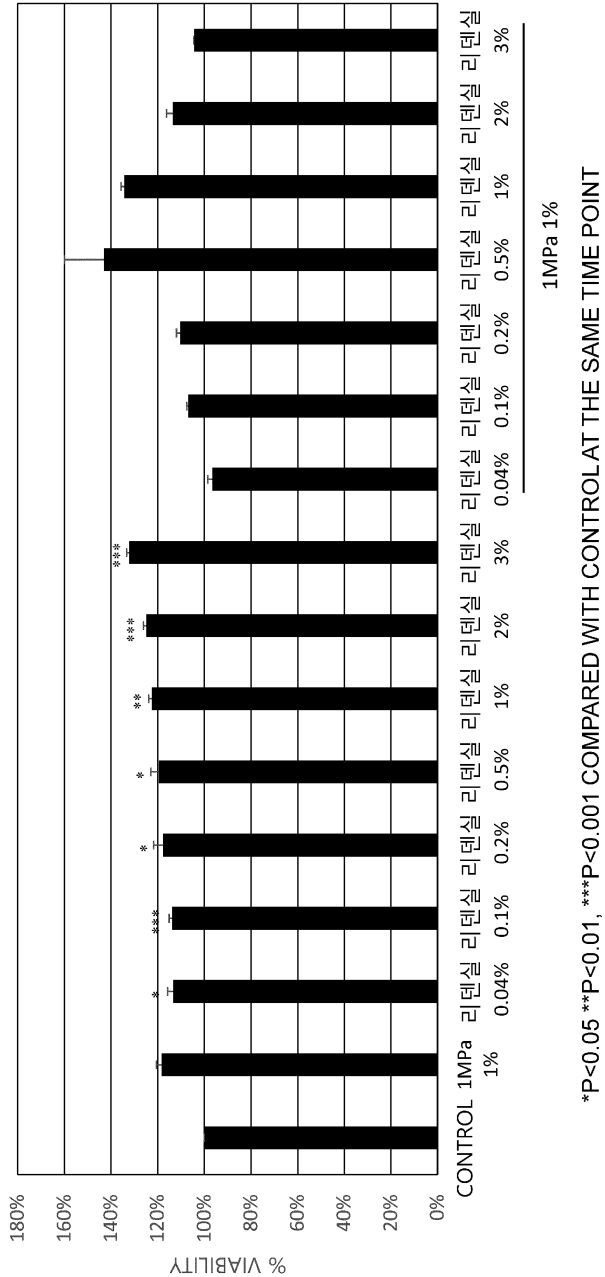
도면22



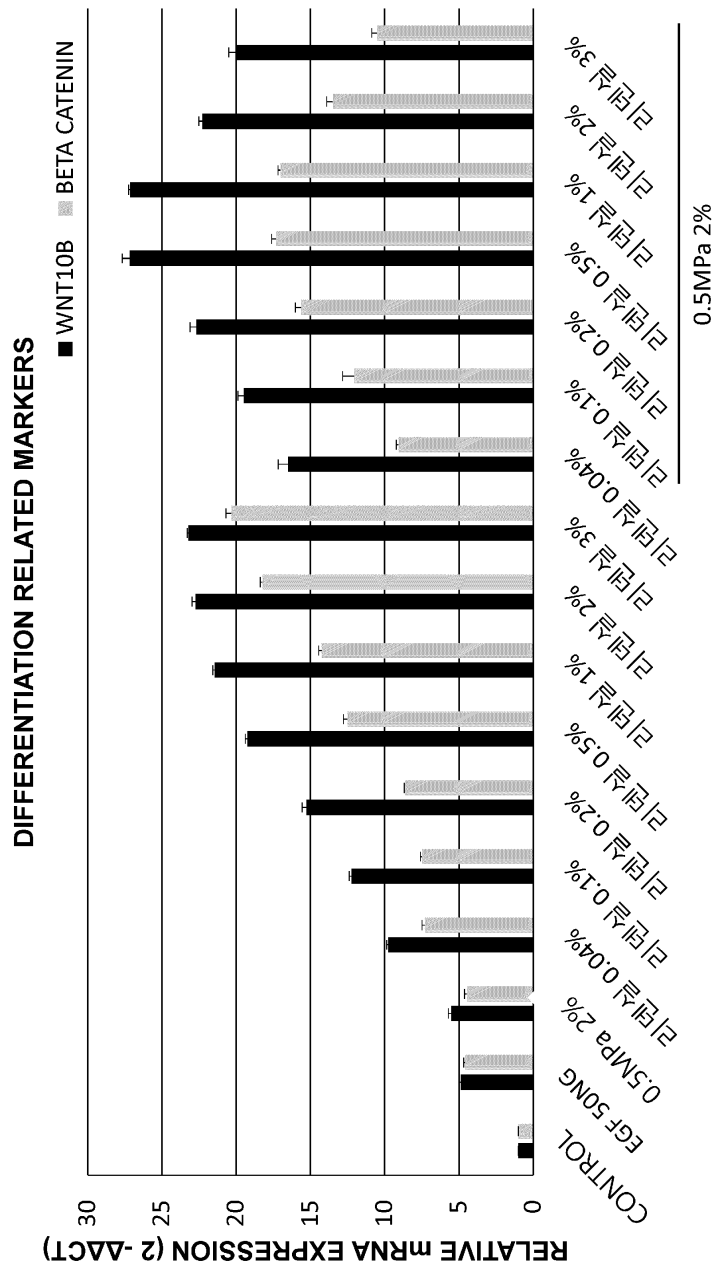
도면23



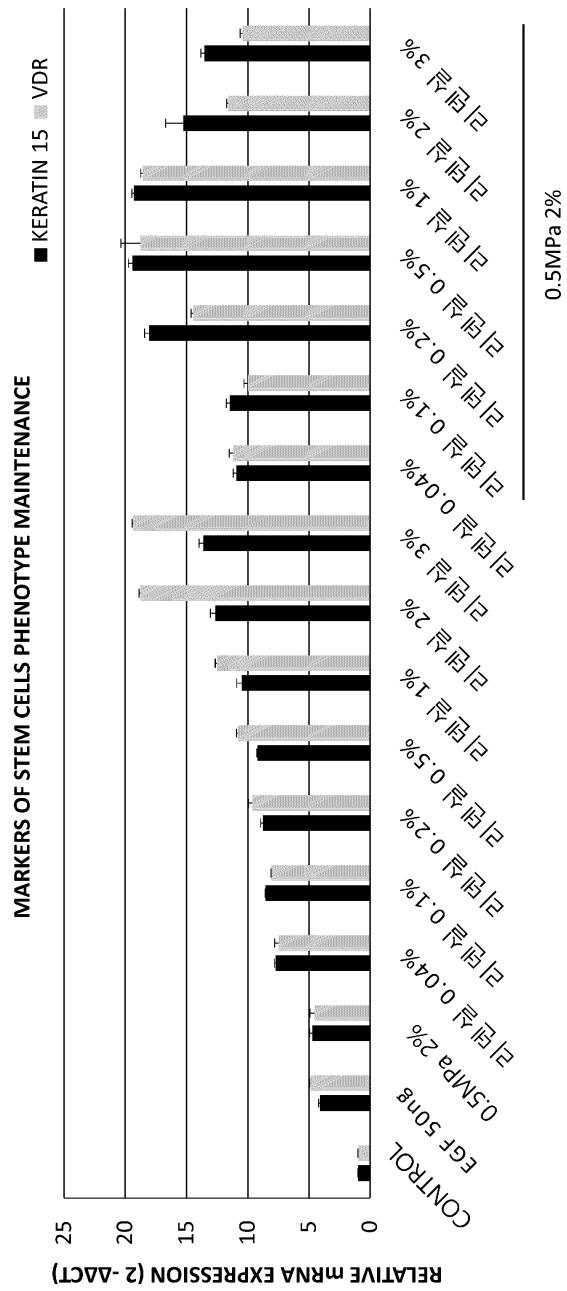
도면24



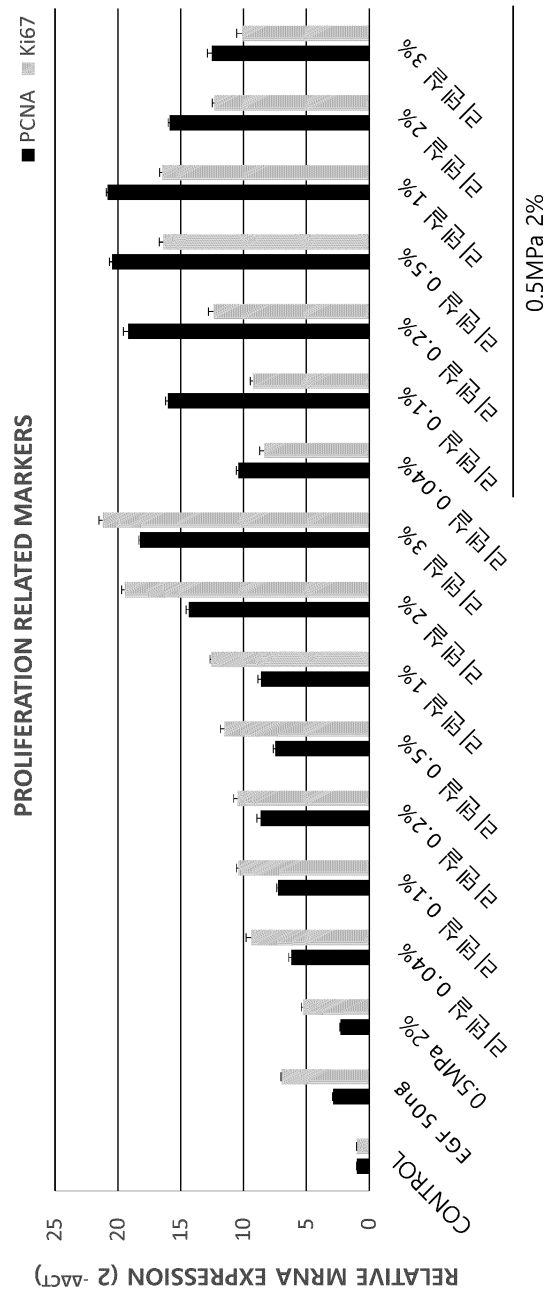
도면26



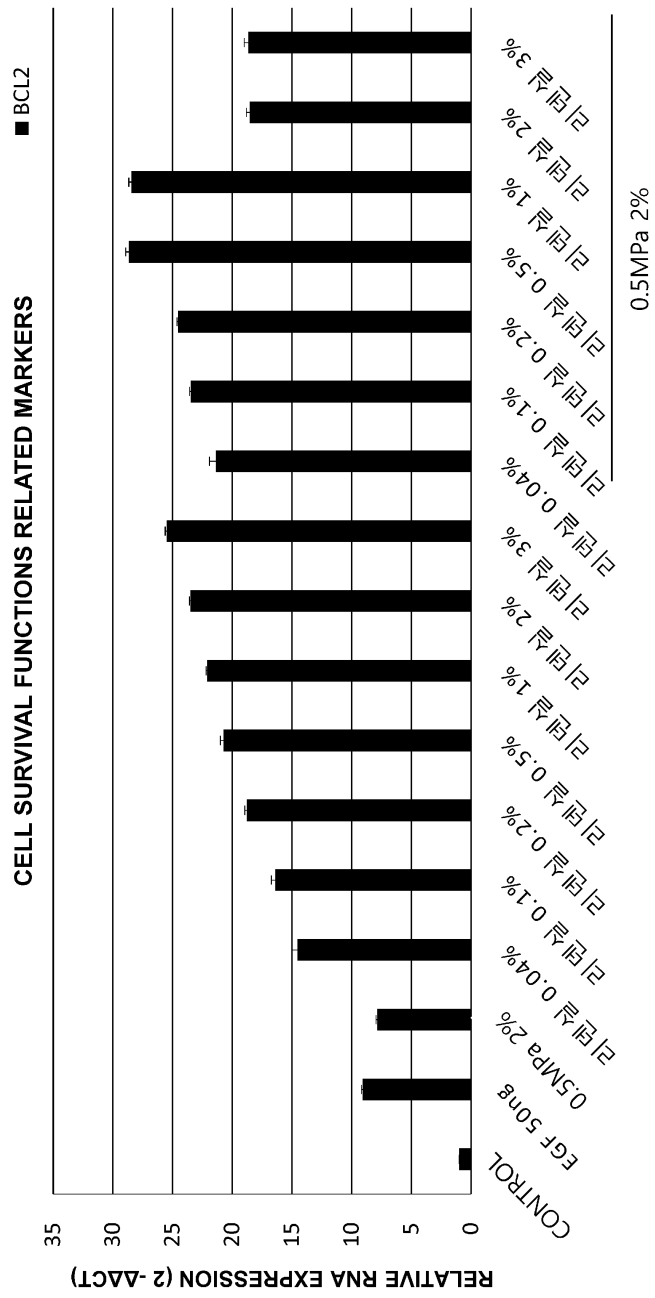
도면27



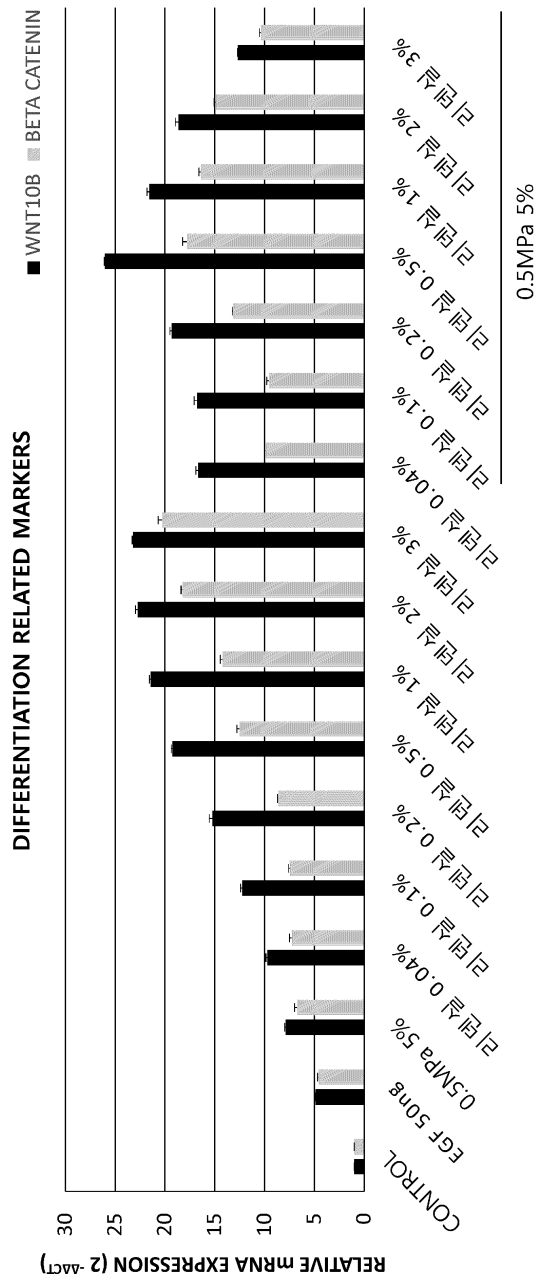
도면28



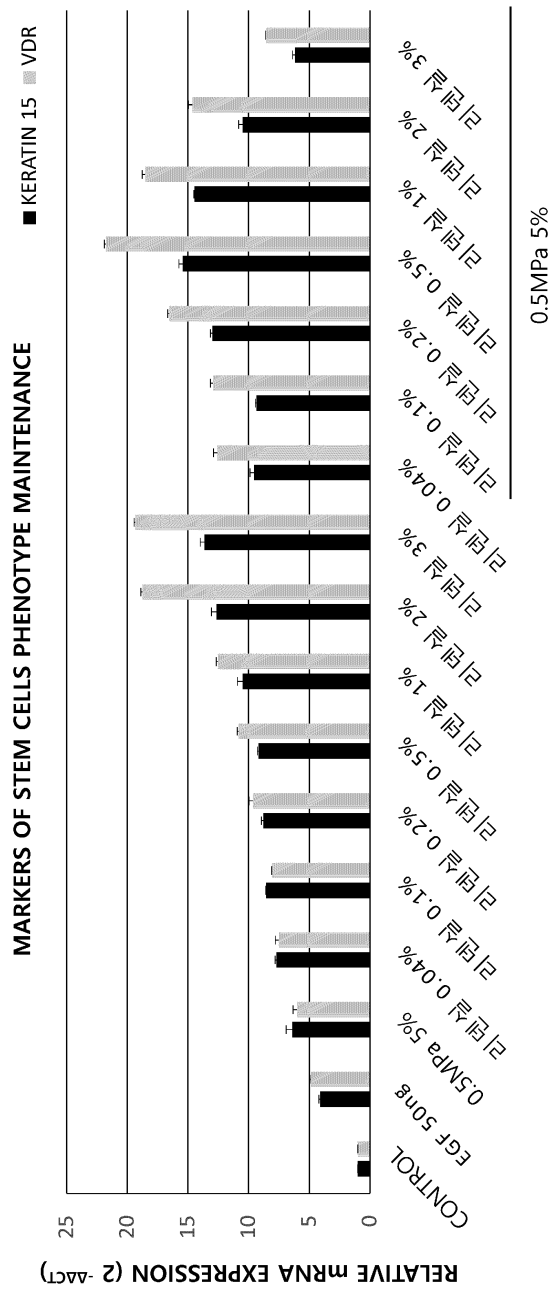
도면29



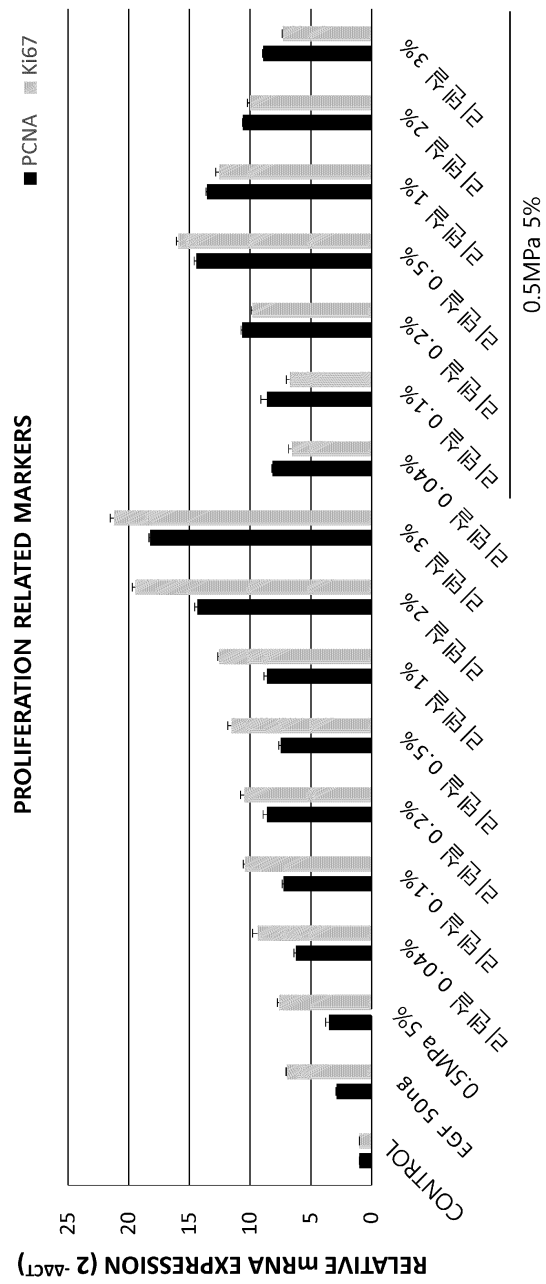
도면30



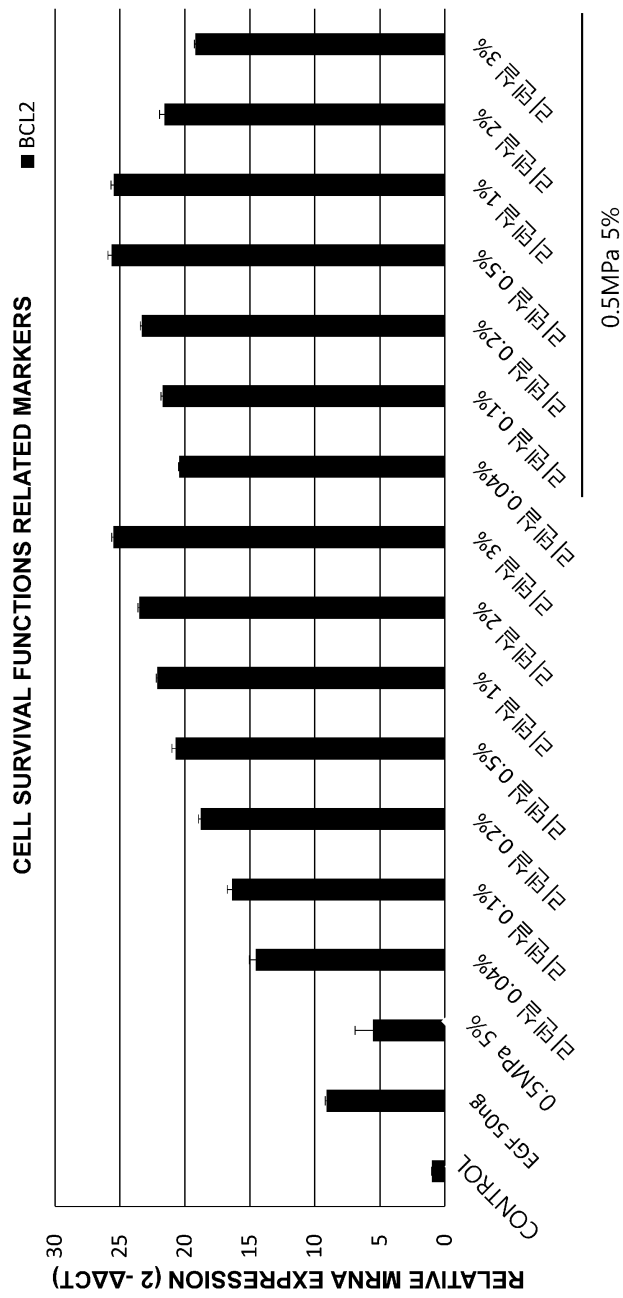
도면31



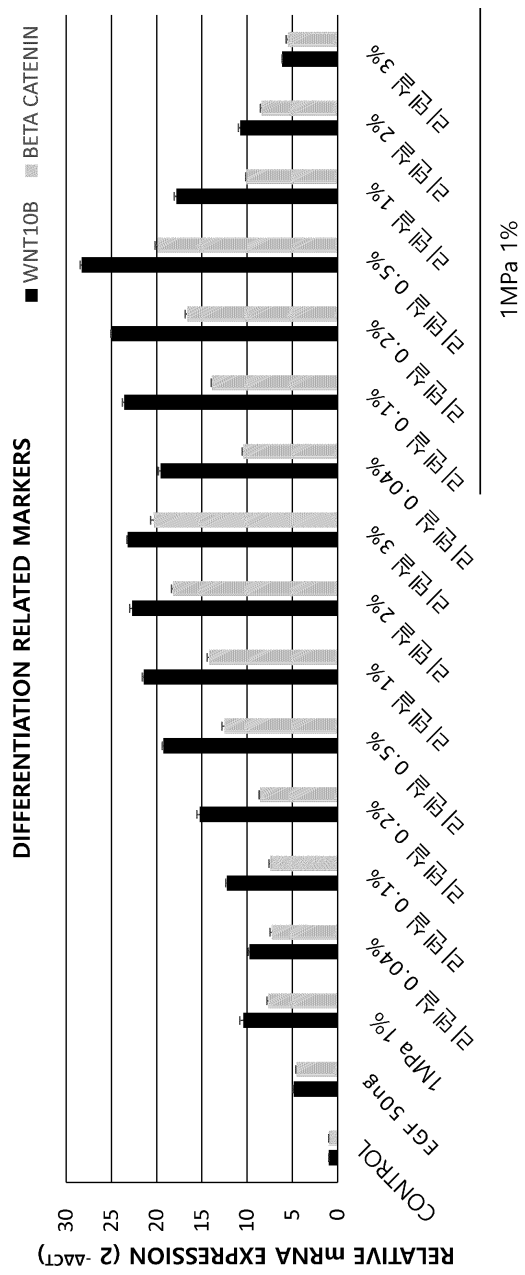
도면32



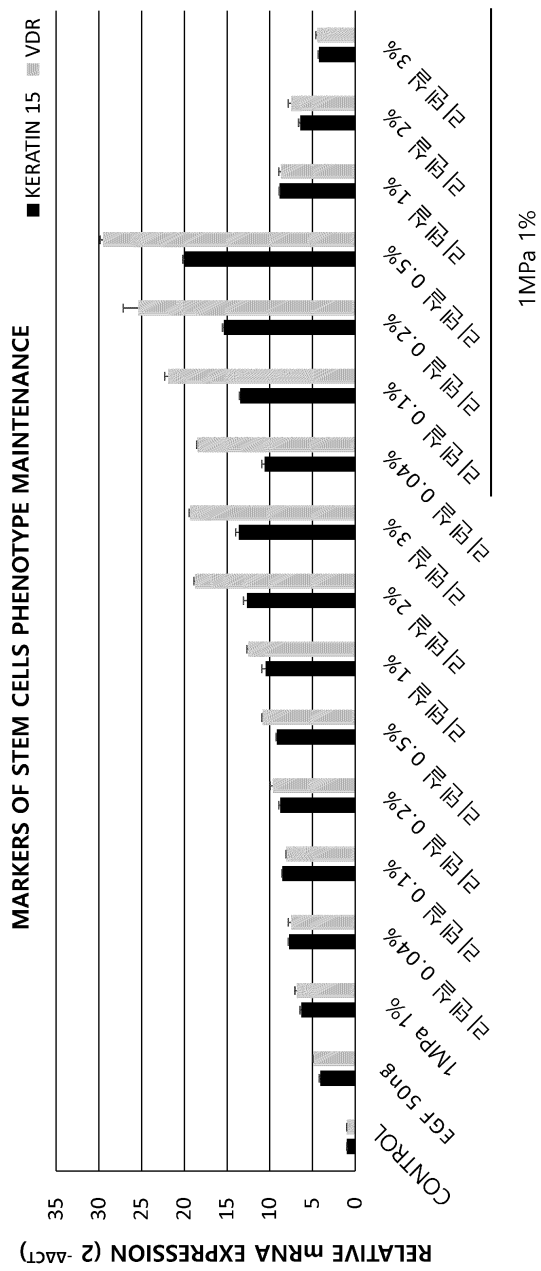
도면33



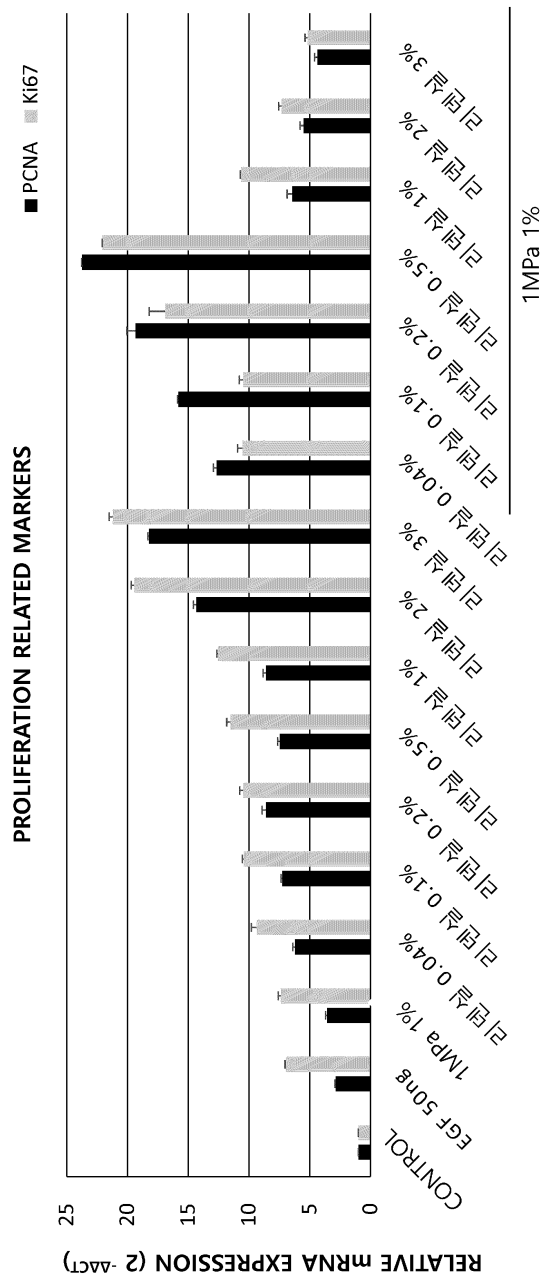
도면34



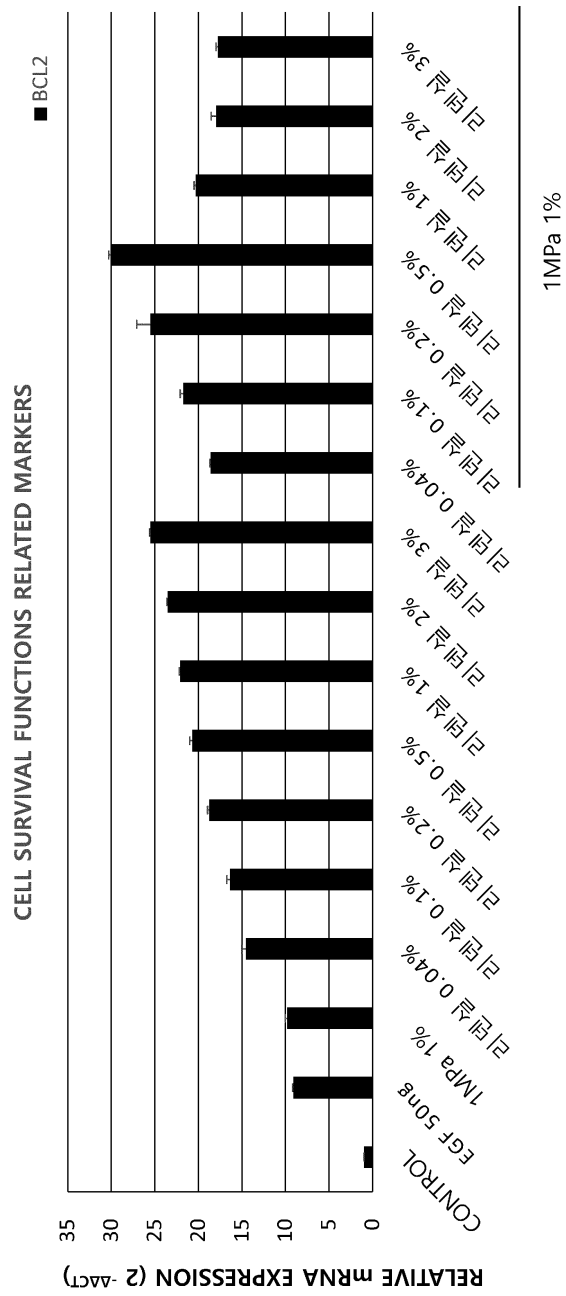
도면35



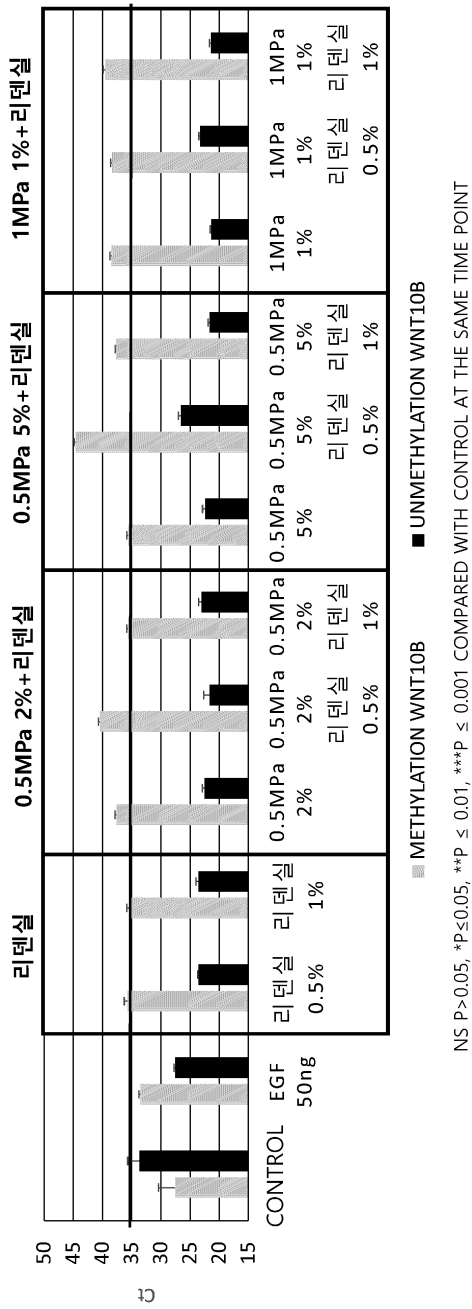
도면36



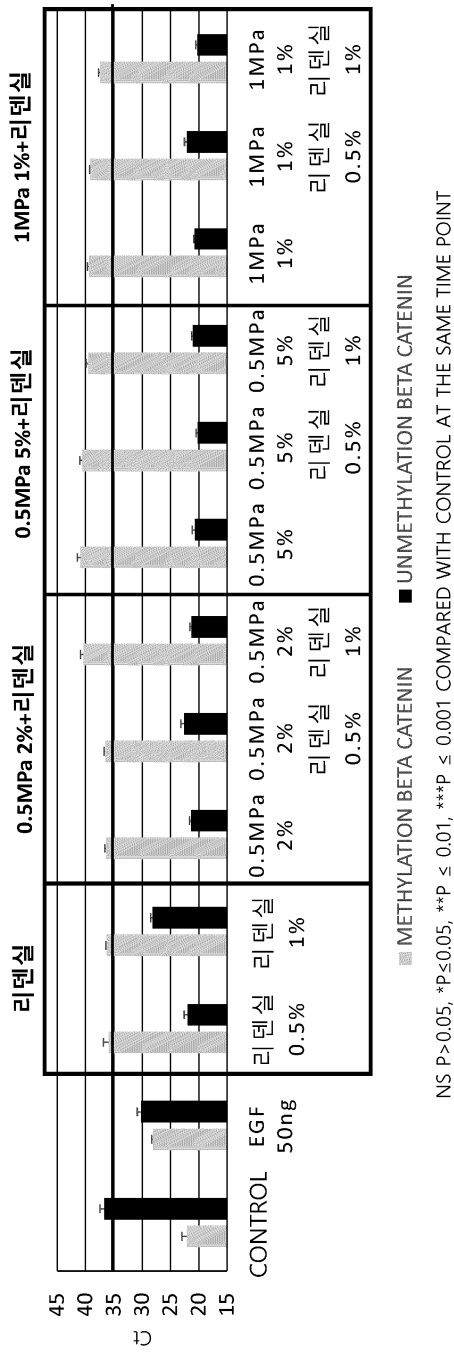
도면37



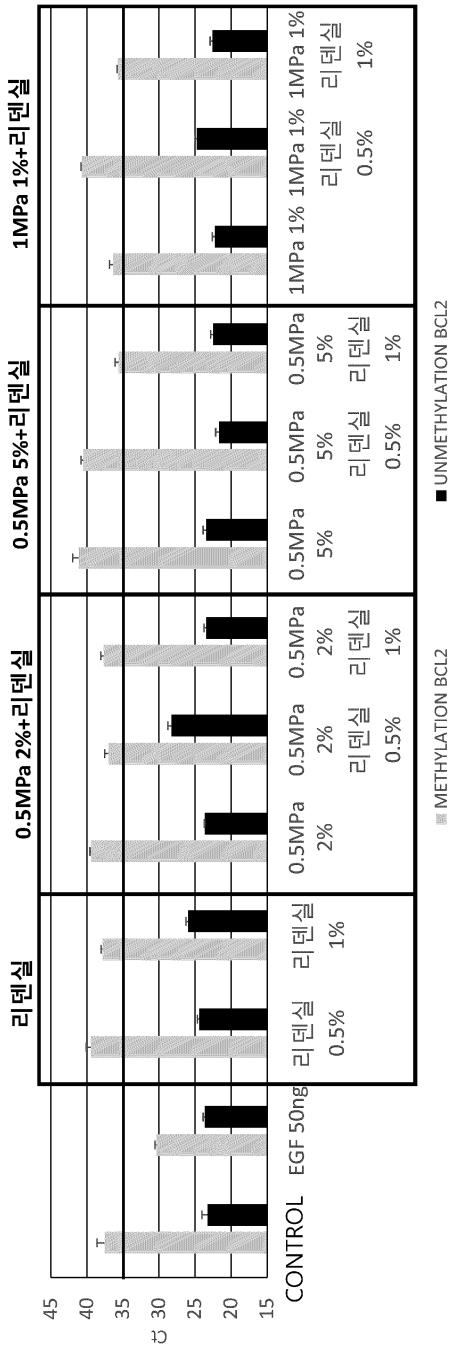
도면38



도면39

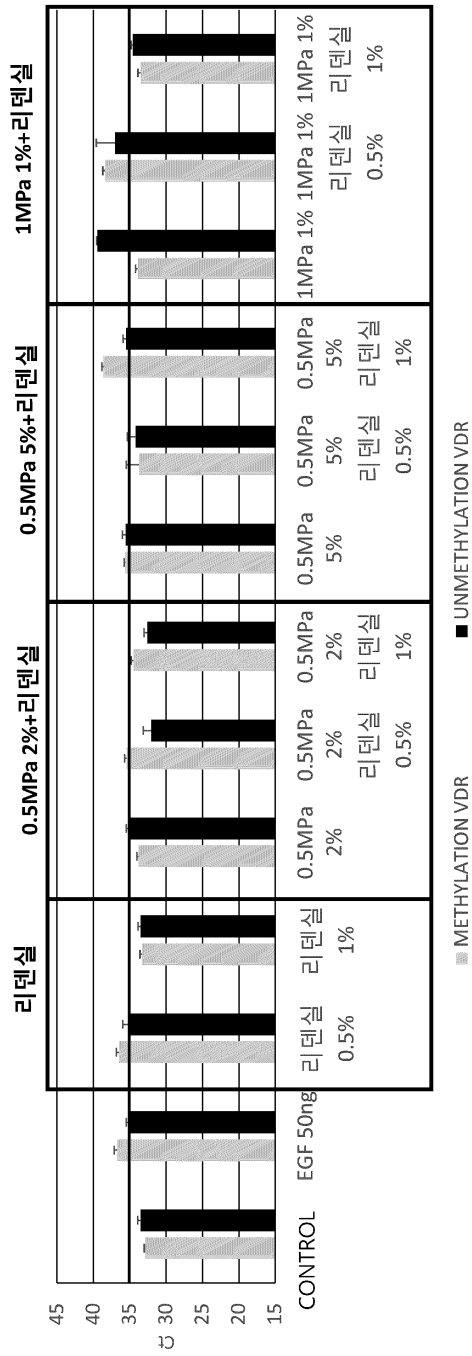


도면40



NS P>0.05, *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001 COMPARED WITH CONTROL AT THE SAME TIME POINT

도면41

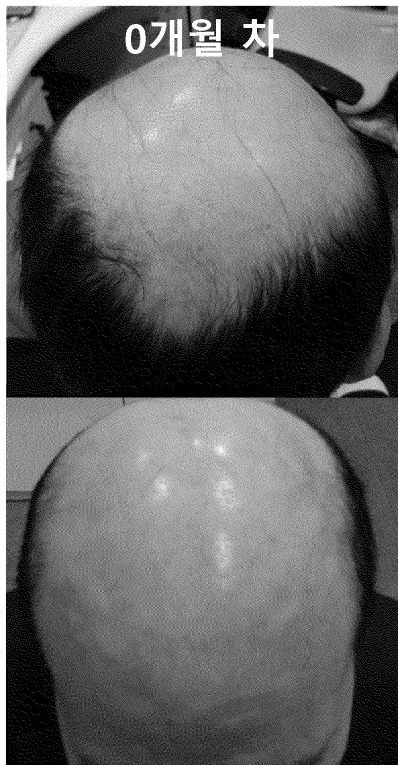


NS P>0.05, *P≤0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 COMPARED WITH CONTROL AT THE SAME TIME POINT

도면42



도면43a



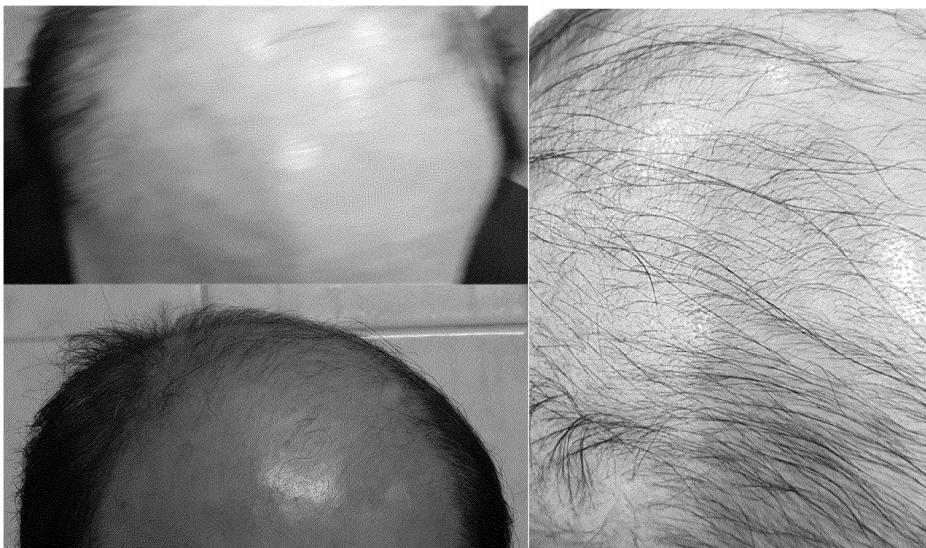
도면43b



도면43c



도면43d



도면44a



도면44b

