

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2024/014752 A1

2024 년 1 월 18 일 (18.01.2024)

WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/009142

(22) 국제출원일: 2023 년 6 월 29 일 (29.06.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0086813 2022 년 7 월 14 일 (14.07.2022) KR

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK
NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC
COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566
대구광역시 북구 대학로 80(산격동, 경북대학교), Daegu
(KR).

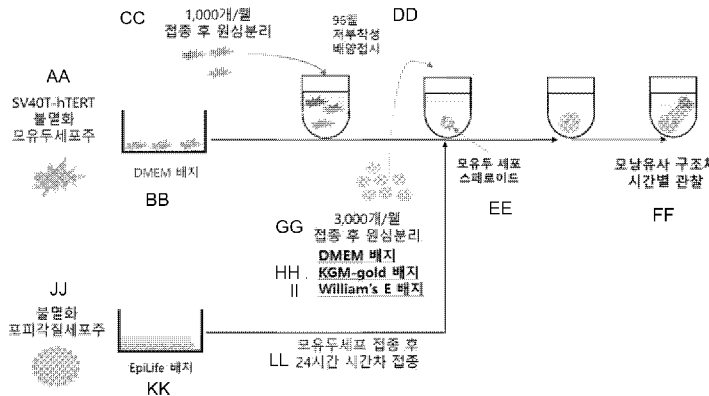
(72) 발명자: 성영관 (SUNG, Young Kwan); 41950
대구광역시 중구 대봉로 260, 103-2204, Daegu (KR).
박순선 (BAK, Soon Sun); 41266 대구광역시 동구
송라로11길 86, 101-1103, Daegu (KR). 김민규 (KIM,
Min Kyu); 42114 대구광역시 수성구 청수로 261,
1414-1503, Daegu (KR). 주현우 (JOO, Hyun Woo);
42802 대구광역시 달서구 송현로7길 10, 1105-1906,
Daegu (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTEL-
LECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08505
서울특별시 금천구 가산디지털2로 101, 비동
1802호(가산동, 한라원엔원타워), 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

(54) Title: METHOD FOR FORMING HAIR-FOLLICLE-LIKE STRUCTURE THROUGH CO-CULTURING OF HU-
MAN-HAIR-FOLLICLE-DERIVED IMMORTALIZED DERMAL PAPILLA CELLS AND KERATINOCYTES

(54) 발명의 명칭: 인간 모낭 유래 불멸화 모유두 세포주 및 각질세포 공배양을 통한 모낭유사 구조체 형성 방법



AA ... SV40T-hTERT immortalized dermal papilla cell line
BB ... DMEM medium
CC ... Centrifugation after inoculation of 1,000 cells/well
DD ... 96-well low attachment culture dish
EE ... Dermal papilla cell spheroids
FF ... Hourly observation of hair-follicle-like structure
GG ... Centrifugation after inoculation of 3,000 cells/well
HH ... KGM-gold medium
II ... William's E medium
JJ ... Immortalized foreskin keratinocyte line
KK ... EpiLife medium
LL ... Delayed inoculation 24 hour after dermal papilla cell

(57) Abstract: The present invention relates to a method for forming a hair-follicle-like structure through the co-culturing of human hair-follicle-derived immortalized dermal papilla cells and keratinocytes. Specifically, it has been identified that, when keratinocytes are three-dimensionally co-cultured with a dermal papilla cell line (SV40T-hTERT DPC) immortalized through the forced expression, in human-hair-follicle-derived dermal papilla cells, of SV40T, which inactivates cancer suppressor genes, and an hTERT gene, which is a telomerase promoting gene, a hair-follicle-like structure in which the stratum corneum grows to be formed similar to a hair-follicle-like structure of a combination of primary cultured hair-follicle-derived cells is formed. Therefore, the present invention can be applied

[다음 쪽 계속]

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

in various fields such as those of non-animal alternative testing and efficacy evaluations of hair loss prevention/hair follicle growth promotion materials, can ensure result consistency higher than that of a conventional technology through immortalized dermal papilla cells, and enables a stable supply of hair-follicle-derived cells, and thus it is expected that high barriers to entry into cell-based efficacy evaluation of materials for hair loss can be removed.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 모낭 유래 불멸화 모유두 세포주 및 각질세포 공배양을 통한 모낭유사 구조체 형성 방법에 관한 것으로, 상세하게는, 인간 모낭 유래 모유두 세포에 암억제 유전자를 불활성화하는 SV40T 과 텔로미어 신장 효소 촉진 유전자인 hTERT 유전자를 강제 발현시켜 불멸화시킨 모유두 세포주(SV40T-hTERT DPC)와 각질세포를 3차원 공배양한 결과, 초대배양(primary culture) 모낭 유래 세포 조합의 모낭 유사체와 유사한 형태로 각질층부가 성장하는 모낭 유사 구조가 형성됨을 확인하였다. 이에, 본 발명은 동물대체시험, 탈모예방/모낭생장촉진 소재의 효능평가 등 다양한 분야에 적용 가능하고, 불멸화된 모유두세포를 통해, 기존 기술 대비 높은 결과 일관성을 확보할 수 있고, 안정적인 모낭 유래 세포 공급을 가능하게 하여, 탈모소재의 세포기반 효능평가에 대한 높은 진입 장벽을 해소할 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 인간 모낭 유래 불멸화 모유두 세포주 및 각질세포 공배양을 통한 모낭유사 구조체 형성 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 모낭 유래 불멸화 모유두 세포주 및 각질세포 공배양을 통한 모낭유사 구조체 형성 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 탈모는 환자에게 심리적, 사회적으로 상당히 부정적인 요인을 주는 질환으로, 최근 현대 사회에서는 유전적 소인 뿐 아니라, 노년인구 증가, 스트레스, 식습관 변화 등의 다양한 요인으로 인해 환자수가 급증하는 추세이다. 이로부터, 기존의 침습적 치료법인 자가모발이식과 약물적 치료법 이외에도 탈모를 극복하고 예방하기 위한 수요가 꾸준히 늘고 있으며, 관련 산업 역시 증가하고 있음. 또한 의약품/의약외품 분야 외에, 기능성화장품, 건강기능식품 산업군에서도 탈모 소재의 중요성이 부각되고 있다.
- [3] 이러한 수요 및 산업군의 성장에도 불구하고, 현재 탈모 관련 소재의 효능 및 안전성을 검증하기 위한 방법은 여타의 기능성 소재 검증 방법에 비해 여러 애로사항이 존재한다. 인체적용시험의 경우 피험자 모집이 다른 질환에 비하여 어려우며, 이로 인하여 시험 소요 기간 및 비용이 높다. 동물 시험의 경우 실험모델과 인체의 생리학적 특성 차이로 인하여 그 효능을 간접적으로 추정 증명하는 수준이며, 최근 전 세계적으로 동물윤리가 부각되고 있어 동물시험 진행이 어렵다. 인체 유래 세포 시험의 경우에는 세포 공여자 간의 차이로 인하여 일관된 결과를 확보하기 어렵고, 실제 인체적용시험과의 결과 괴리가 가장 크다.
- [4] 이러한 효능 검증의 애로사항으로 발생하는 다양한 문제점(인체적용시험 결과와 세포시험 결과의 불일치, 높은 효능 검증 비용과 소요 시간 등)은 탈모 관련 기능성 소재 및 제품의 신뢰도를 저해하며, 기능성 제품 산업군의 성장을 막는 진입장벽으로 작용한다. 따라서 동물윤리를 준수하며, 인체적용시험 결과와 유사하며, 결과의 일관성과 안정성이 보장된 새로운 세포 기반 효능평가 시스템의 필요성이 대두되고 있다.
- [5] 최근 선행 연구에서, 인체 모낭 유래 세포를 이용하여 체내 모낭구조와 유사한 세포 구조체의 형성법 및 효능평가에 대한 적용 가능성이 발표된 바 있으나, 해당 연구에서 사용된 세포는 초대배양 세포로, 공여자 간의 세포 차이, 세포 계대수에 따른 급격한 특성 변화 등으로 일관된 결과를 얻기 힘들다는 문제점이 여전히 존재한다. 또한, 제한적인 모낭 공여로 인해 모낭 유래 초대 세포를 안정적으로 확보하기 어려운 단점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 불멸화된 모유두세포 및 각질세포를 3차원 공배양하는 단계를 포함하는 모낭유사 구조체 형성 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 모낭으로부터 모유두세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 모유두세포를 불멸화시키는 단계; 및 (3) 상기 불멸화된 모유두세포 및 각질세포를 3차원 공배양하는 단계를 포함하는 모낭유사 구조체 형성 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [8] 본 발명은 인간 모낭 유래 불멸화 모유두 세포주 및 각질세포 공배양을 통한 모낭유사 구조체 형성 방법에 관한 것으로, 상세하게는, 인간 모낭 유래 모유두 세포에 암억제 유전자를 불활성화하는 SV40T 과 텔로미어 신장 효소 촉진 유전자인 hTERT 유전자를 강제 발현시켜 불멸화시킨 모유두 세포주(SV40T-hTERT DPC)와 각질세포를 3차원 공배양한 결과, 초대배양(primary culture) 모낭 유래 세포 조합의 모낭 유사체와 유사한 형태로 각질층부가 성장하는 모낭 유사 구조가 형성됨을 확인하였다. 이에, 본 발명은 동물대체시험, 탈모예방/모낭성장촉진 소재의 효능평가 등 다양한 분야에 적용 가능하고, 불멸화된 모유두세포를 통해, 기존 기술 대비 높은 결과 일관성을 확보할 수 있고, 안정적인 모낭 유래 세포 공급을 가능하게 하여, 탈모소재의 세포기반 효능평가에 대한 높은 진입 장벽을 해소할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 인체 모낭 유래 모유두세포 및 외모근초세포 초대배양 모식도를 나타낸다.
- [10] 도 2는 모유두 세포 불멸화 과정 및 결과를 나타낸다.
- [11] 도 3은 초대배양 모유두세포와 불멸화 모유두 세포 간의 스페로이드 성장 패턴 비교 확인 모식도를 나타낸다.
- [12] 도 4는 초대배양 모유두세포와 불멸화 모유두 세포 스페로이드를 이용한 모낭 유사 구조체 형성 확인 모식도를 나타낸다.
- [13] 도 5는 불멸화 세포만을 이용한 모낭유사 구조체 형성 여부 확인 모식도를 나타낸다.
- [14] 도 6은 형성된 모낭 유사 구조체의 세포 배열 형태 확인 모식도를 나타낸다.
- [15] 도 7은 초대배양 모유두세포 스페로이드와 SV40T-hTERT 도입 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC 스페로이드의 성장 패턴 비교 결과를 나타낸다.
- [16] 도 8은 배양 시간에 따른 스페로이드 크기 변화 결과를 나타낸다. SV40T-hTERT DPC 스페로이드의 초기 세포수 및 배양 시간에 따른 직경의 경우, 초기 세포수 $\leq 1K$, 배양 시간 $\leq 72hr$ 조건에서 기존에 알려진 모낭 내 모유두 크기와 비슷한 직경의 스페로이드를 형성하였고(A), 72시간 배양한 스페로이드의 관찰 결과, 초대배양 세포이용 스페로이드 대비 SV40T-hTERT DPC 이용 스페로이드가

스페로이드 내부 세포 배치가 더욱 조밀하고, 초기 세포수가 적더라도 72hr 배양 시 직경은 비슷한 규모로 확인되었다(B 내지 F).

[17] 도 9는 초대배양 모유두세포(Primary DPC) 혹은 불멸화 모유두 세포주(SV40T-hTERT DPC) 스페로이드와 인간모낭 외모근초세포 ORSC의 공배양을 이용한 모낭유사구조를 나타낸다. 시간에 따른 Primary DPC 혹은 SV40T-hTERT DPC와 인간 모낭 유래 외모근초세포와의 공배양 결과(A), 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC와 외모근초세포(ORSC)의 공배양 시작 일자에 따른 모낭유사 구조체 형성 결과 (B), 외모근초세포 세포수에 따른 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC와 외모근초세포 공배양 결과(C).

[18] 도 10은 시간에 따른 배지 조건별/ 모낭유사 구조체 형성 결과를 나타낸다. 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC 1,000 세포수의 스페로이드에, 1,000(A), 3000(B)개의 각질세포주를 공배양한 결과를 나타낸다.

[19] 도 11은 불멸화 세포만을 이용한 모낭유사 구조체의 각질세포주 수량별 세포 배열 상태 확인 결과를 나타낸다.

[20] 도 12는 모낭유사 구조체를 동결 절편하여 면역조직염색을 실시하여 모낭유사 구조체 내 세포 바이오마커를 확인한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21] 본 발명은 (1) 모낭으로부터 모유두세포를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 모유두세포를 불멸화시키는 단계; 및 (3) 상기 불멸화된 모유두세포 및 각질세포를 3차원 공배양하는 단계를 포함하는 모낭유사 구조체 형성 방법을 제공한다.

[22] 바람직하게는, 상기 불멸화된 모유두세포는 simian virus 40T(SV40T) 항원 및 텔로머라제 역전사효소(telomerase reverse transcriptase; hTERT)를 발현하는 모유두세포(SV40T-hTERT DPC)될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[23] 바람직하게는, 상기 각질세포는 모낭 유래 외모근초세포(out root sheath cell; ORSC) 또는 피부각질세포주 Ker-CT일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[24] 바람직하게는, 상기 (3) 단계에서 상기 불멸화된 모유두세포 및 각질세포의 세포비는 1:1 내지 1:4일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[25] 바람직하게는, 상기 (3) 단계는 상기 불멸화된 모유두세포 배양 직후 내지 배양 72시간 이내에, 상기 각질세포를 첨가하여 3차원 공배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[26] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[27]

[28] <실험예>

- [29] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [30]
- [31] **1. 인체 모낭 유래 세포 배양 및 모유두세포 불멸화**
- [32] 사람 모낭조직은 경북대학교 모발이식센터에서 환자의 동의하에 자가모발이식술 후 잔여 모발을 제공받아 실험을 진행하였다.
- [33] 모발 조직에서 모구를 절단하여 분리한 모유두를 페니실린 (100U/ml), 스트렙토마이신 (100ug/ml)과 20% 열비활성 혈청을 첨가한 DMEM (Hyclone) 에서 배양하여 모유두세포(DPC)를 분리하였다. 배양배지에 안착한 모유두 조직으로부터 세포가 자라면 0.25% trypsin/10mM EDTA를 이용하며 세포를 모으고, 5% CO₂와 37°C의 조건아래 10% 열비활성화 혈청이 첨가된 DMEM에서 유지하였다.
- [34] 모발 조직에서 모간을 절단한 뒤 collagen type 1 이 코팅된 배양접시에 페니실린 (100U/ml), 스트렙토마이신 (100ug/ml)과 20% 열비활성 혈청을 첨가한 DMEM (Hyclone) 에 5% CO₂와 37°C의 조건에서 배양한 뒤, 모간이 배양접시 바닥에 안착했을 때, 페니실린 (100U/ml), 스트렙토마이신 (100ug/ml), EpiLife™ Defined Growth Supplement (Gibco) 가 포함된 각질세포 전용 배양배지인 EpiLife(Gibco) 배지에 5% CO₂와 37°C의 조건으로 배양하였다(도 1).
- [35] 모유두 세포의 불멸화 방법은 본 연구진의 이전 선행연구에 기술되었는데 (BMB Reports. 44:8 512-516. 2011), 간략하게는, SV40T 항원과 Neomycine 저항 유전자를 포함하는 pSV3neo plasmid를 형질주입한 뒤, Neomycine 함유 배지에서 배양하여 생존한 세포를 선별한 뒤, 면역분석법을 통해 SV40T 항원 발현을 확인하여 SV40T 항원 발현 모유두 세포를 확보하였다. 확보한 SV40T 항원 발현 모유두 세포에, 인간 텔로미어 신장효소 역전사 효소 hTERT 유전자와 Hygromycine 을 포함하는 pGRN145 plasmid를 형질주입한 뒤, Hygromycine 포함 배지에서 배양하여 생존한 세포를 선별한 뒤, 면역분석법과 역전사 중합효소 연쇄반응으로 SV40T 항원과 hTERT를 발현하는 세포를 확인하여 불멸화된 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC를 확보하였다(도 2).
- [36] 불멸화된 인간 피부각질세포주 Ker-CT를 ATCC에서 구매하여, collagen type 1 코팅된 배양 배지에서 5% CO₂와 37°C의 조건 아래 Lonza사의 KGM-Gold™ BulletKit™ 으로 배양하였다.
- [37]
- [38] **2. 모유두세포와 불멸화 모유두 세포 간의 스페로이드 성장 패턴 비교확인**
- [39] 본 발명자들의 선행 연구에서, 초대 배양한 모유두 세포와 불멸화한 모유두 세포 간의 유전자 발현 및 성장 특성을 확인하여 유사성을 검증한 바 있다. 해당 선행연구에서 주목할 만한 결과로, 초대 배양 모유두 세포와 불멸화 모유두 세포 간의 성장 속도가 유의한 차이를 보임에 따라, 모낭세포 스페로이드 형성 시 초기 세포수에 따른 스페로이드 크기 변화를 측정하였다.

- [40] 배양접시에 평판 배양한 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC와 초대 배양 모유두 세포(Primary DPC)를 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, U bottom low attachment 96 well plate 에 불멸화 모유두 세포주(SV40T-hTERT DPC) 500, 1000, 3000 세포/well, 초대배양 모유두 세포(Primary DPC) 3,000 세포/well로 투입하여 5% CO₂와 37°C, 10% 열비활성화 혈청이 첨가된 DMEM 100μl/well 조건에서 16시간 이상 배양하여 스페로이드(spheroid)를 형성하였다. 이후 24시간마다 현미경으로 촬영 후 스페로이드의 직경을 측정하여 관찰하였다(도 3).
- [41]
- [42] **3. 모유두세포와 불멸화 모유두 세포 스페로이드를 이용한 모낭유사 구조체 형성 확인**
- [43] 스페로이드를 형성하기 위하여, 배양접시에 평판 배양한 초대배양 모유두세포와 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC 를 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, U bottom low attachment 96 well plate 에 1,000 세포/well로 투입하여 5% CO₂와 37°C, 10% 열비활성화 우태아혈청이 첨가된 DMEM 100μl/well 조건에서 배양하였다.
- [44] 이후 배양접시에 평판 배양한 외모근초세포를 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, penicillin/streptomycin 100U/ml, hydrocortisone 10ng/ml, insulin 10ug/ml, L-glutamin 2mM 이 포함된 William's E 배지에 30,000 세포/ml 로 희석하여 상기 기술한 low attachment 96 well plate 에 100μl/ well 씩 추가한 뒤 5% CO₂와 37°C의 조건아래 공배양하며 현미경 하에서 시간별로 관찰하였다.
- [45] 세포 조합에 따른 모낭 유사구조 형성 정도의 비교를 위해서, 스페로이드 형성 시, 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC의 수를 조절하여 스페로이드당 불멸화 모유두 세포수를 최소 300개에서 최대 1000개로 조절하였고, 모유두 세포-각질세포 공배양 시작 시간에 따른 모낭유사구조 형성 정도의 비교를 위해 각질세포의 주입 시기를 모유두세포 주입 직후로부터 모유두세포 주입 후 72시간 배양 후까지 조절하였다. 또한, 모낭 유래 각질세포의 수를 불멸화 세포 대비 동수에서 3배수로 조절하여 실험을 진행하였다(도 4).
- [46]
- [47] **4. 불멸화 세포만을 이용한 모낭유사 구조체 형성 여부 확인**
- [48] 평판 배양한 SV40T-hTERT DPC를 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, U bottom low attachment 96 well plate 에 1,000 세포/well로 투입하여 5% CO₂와 37°C, 10% 열비활성화 혈청 첨가 DMEM 100μl/well 조건에서 24시간 배양, 스페로이드를 형성하였다.
- [49] 이후 배양접시에 평판 배양한 불멸화 각질세포주 Ker-CT를 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, 모유두세포 생장용 배지인 10% 열비활성화 우태아혈청이 함유된 DMEM, penicillin/streptomycin 100U/ml, hydrocortisone 10ng/ml, insulin 10ug/ml, L-glutamin 2mM 이 포함된 조직배양용 배지인 William's E, 각질

세포주 생장용 배지인 KGM Gold Medium Bulletkit 각각의 조건하에 30,000 세포/ml 로 희석하여 상기 기술한 low attachment 96 well plate 에 100 μ l/ well 씩 추가한 뒤 5% CO₂와 37°C의 조건아래 공배양하며 24시간마다 관찰하였다(도 5).

[50]

[51] **5. 형성된 모낭 구조체의 세포 배열 형태 확인**[52] 배양접시에 평판 배양한 불멸화 모유두 세포주 SV40T-hTERT DPC의 배지를 제거하고, Cell tracker 인 CM-DiI 1 μ M 가 포함된 인산완충생리식염수(PBS)를 30분간 처리하였다. 이후 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, U bottom low attachment 96 well plate 에 1,000 세포/well로 투입하여 5% CO₂와 37°C, 10% 열비 활성화 혈청이 첨가된 DMEM 100 μ l/well 조건에서 24시간 배양하여 스페로이드를 형성하였다.[53] 이후 배양접시에 평판 배양한 각질세포를 0.25% trypsin/10mM EDTA로 걷은 뒤, penicillin/streptomycin 100U/ml, hydrocortisone 10ng/ml, insulin 10ug/ml, L-glutamin 2mM 이 포함된 William's E 배지에 30,000 세포/ml 로 희석하여 상기 기술한 low attachment 96 well plate 에 100 μ l/ well 씩 추가한 뒤 5% CO₂와 37°C의 조건아래 공배양하며 24시간마다 광학현미경 및 형광현미경으로 관찰하였다(도 6).

[54]

[55] <실시예 1> 모유두세포와 불멸화 모유두 세포 간의 스페로이드 생장 패턴

[56] 인체 모낭 내 모유두의 크기는 약 100~250 μ m의 크기를 가짐이 알려진 바 있다. 이로부터 약 250 μ m 내외 직경의 모유두 세포 스페로이드를 형성하기 위하여, 96well U bottom Plate 1 well 당 3,000 개의 초대배양한 모유두 세포(primary DPC)를 주입한 결과 250 μ m 내외의 직경을 가지는 스페로이드를 확인할 수 있었고, 시간의 경과에 따른 스페로이드의 크기는 약간의 감소함을 확인하였다. 96well U bottom Plate 1 well 당 3,000 개의 SV40T-hTERT DPC 주입 후 스페로이드 생장 패턴은 Primary DPC 와 달리, 일정 시간 이후 스페로이드 크기의 증가를 확인하였다. 스페로이드 내 세포의 비율은 초대배양 모유두 세포 대비 그 밀도가 높음을 확인하였다(도 7 및 도 8).

[57] 따라서 모낭유사 구조체 제조를 위해 불멸화 모유두 세포를 사용하여 스페로이드를 형성할 때, 초대배양 모유두 세포 스페로이드와 유사한 형태를 제조하기 위해서는 세포수와 배양 시간을 조절해야 하며, 본 발명에서는 불멸화 모유두세포의 경우 기존 초대배양 모유두세포 대비 1/3배의 세포수, 스페로이드 형성 시간 72시간 내의 기준에서 불멸화 모유두세포의 생장패턴이 모유두세포 생장패턴과 유사함을 확인하였다(도 8).

[58]

[59] < 실시예 2> 모유두세포와 불멸화 모유두 세포 스페로이드를 이용한 모낭유사 구조체 형성 확인

- [60] 모낭유사 구조체를 형성하기 위하여, 모낭 유래 각질세포인 외모근초세포를 스페로이드가 형성된 U bottom plate에 주입한 결과, 초대 배양한 모유두세포와 SV40T-hTERT DPC 세포 구분없이 모낭과 유사한 구조의 모낭유사 구조체의 형성을 확인할 수 있었다(도 9). 외모근초세포의 투여 시기를 조절하여 시험한 결과, 스페로이드 형성을 위해 모유두 세포를 주입 후 24시간 내에 외모근초세포를 주입하였을 때 모낭유사 구조체의 형성이 원활함을 확인하였다(도 9B). 모유두 세포 및 외모근초세포의 주입량을 조절하여 시험한 결과, 초대배양 모유두 세포의 경우 동수의 외모근초세포, SV40T-hTERT DPC의 경우 모유두세포 대비 3배수의 외모근초세포 조건에서 모낭유사 구조체의 생장이 두드러졌다. 위로부터 형성된 스페로이드와 각질세포 간 일정 비율을 유지하였을 때 모낭유사 구조체의 생장이 두드러짐을 확인하였다. 모낭 구조를 형성하는 데 모유두 세포와 외모근초세포의 세포비는 1:3~1:4 정도가 최적임을 확인할 수 있었다(도 9C).
- [61]
- [62] < 실시예 3> 불멸화 세포만을 이용한 모낭유사 구조체 형성 여부 및 세포 배열 상태 확인
- [63] 전체 불멸화 세포 모낭유사 구조체를 형성하기 위하여, 인간 신생포피세포를 불멸화한 세포주 Ker-CT를 이용하여 모낭유사구조 형성 시험을 진행한 결과, 외모근초세포 이용 모낭유사 구조체와 유사한 형태의 모낭유사구조 세포체의 형성을 확인하였다. 세포수 1,000개의 SV40T-hTERT DPC 스페로이드에, 1,000개의 각질세포주를 공배양한 결과와 3,000개의 각질세포주를 공배양한 결과, 모두 모낭유사 세포 구조를 형성함을 확인할 수 있었다(도 10 및 도 11). 3가지 배지 조건을 비교하였을 때, 다른 배지조건에 비해 조직배양용 배지인 William's E 배지 조건에서 모낭유사구조가 가장 길게 뻗어남을 확인할 수 있었다(도 10). 각질세포주 Ker-CT의 경우 동수의 모낭 외모근초세포 주입 시 형성되지 않은 1,000개 세포수 주입 시에도 모낭유사구조 형태를 형성함을 확인할 수 있었다(도 9C, 도 10). 위 결과로부터 모낭유사구조 생성이 확인된 조직배양용 배지에 1,000개 세포수의 불멸화 모유두세포스페로이드와 3,000개 세포수의 각질세포주 조합으로 조직배양용 배지인 William's E 배지 조건 하에서 공배양한 결과 가장 모낭과 유사한 모낭 구조체의 형성을 확인할 수 있었다(도 10B 및 도 11).
- [64] 불멸화 모유두 세포에 세포 표지자를 부착하여 형성된 모낭유사 구조체를 형광 관찰하여 체내 모낭 모구부 내에 위치한 모유두와 유사한 형태의 세포 배열 구조를 가짐을 확인하였다. 세포 표지자 부착 시험 결과, 세포 구조체의 모유두 세포 주로 이루어진 스페로이드와 각질 세포주가 모낭과 유사한 구조를 형성함을 확인할 수 있었다(도 11).
- [65] 또한, 모낭유사 구조체를 동결 절편하여 면역조직염색을 실시하여 모낭유사 구조체 내 세포 바이오마커를 확인하였다. 면역조직염색 결과, 모유두 세포주 특이적 바이오마커인 Vimentin과 각질세포주 특이적 바이오마커인 keratin 14의 발현

을 확인하였다. 이로부터 모낭유사 구조체 내부는 인체 모낭과 유사한 형태로 세포가 분포함을 확인할 수 있었다(도 12).

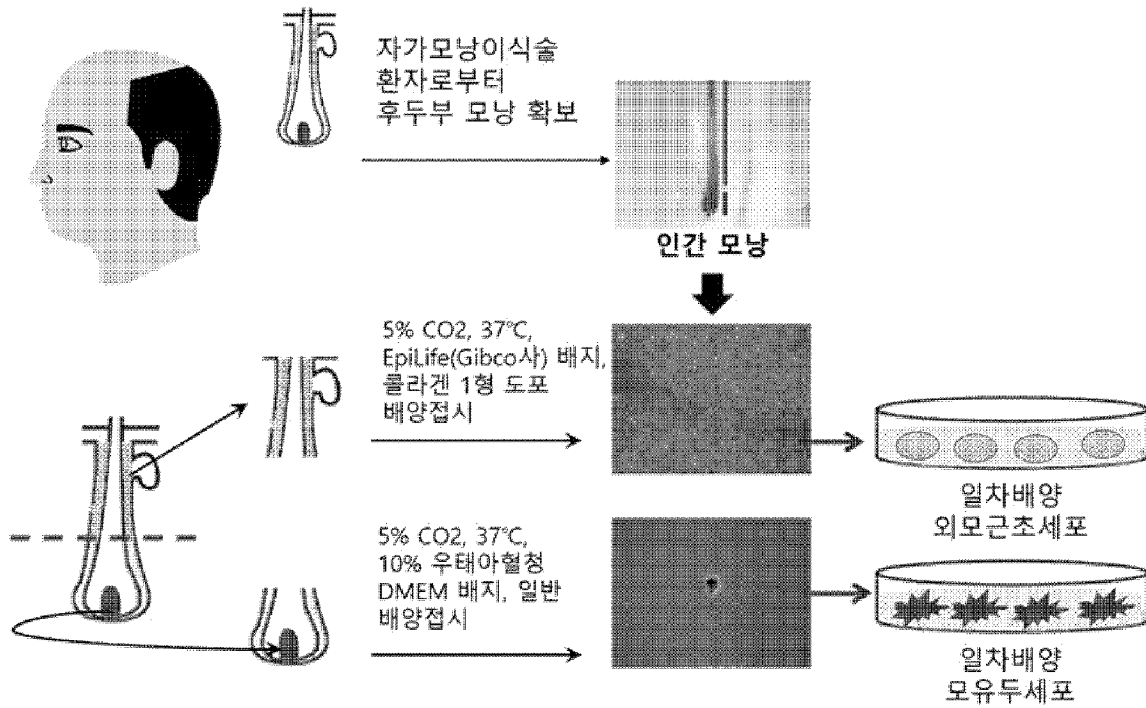
[66]

[67] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

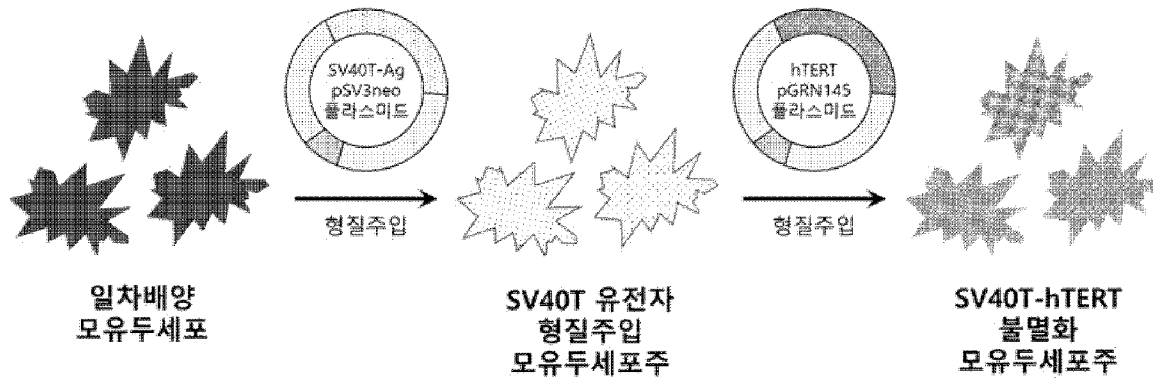
청구범위

- [청구항 1] (1) 모낭으로부터 모유두세포를 분리하는 단계;
(2) 상기 분리된 모유두세포를 불멸화시키는 단계; 및
(3) 상기 불멸화된 모유두세포 및 각질세포를 3차원 공배양하는 단계를 포함하는 모낭유사 구조체 형성 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 불멸화된 모유두세포는 simian virus 40T(SV40T) 항원 및 텔로머라제 역전사효소(telomerase reverse transcriptase; hTERT)를 발현하는 모유두세포인 것을 특징으로 하는 모낭유사 구조체 형성 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 각질세포는 모낭 유래 외모근초세포(out root sheath cell; ORSC) 또는 피부각질세포주 Ker-CT인 것을 특징으로 하는 모낭유사 구조체 형성 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 (3) 단계에서 상기 불멸화된 모유두세포 및 각질세포의 세포비는 1:1 내지 1:4인 것을 특징으로 하는 모낭유사 구조체 형성 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (3) 단계는 상기 불멸화된 모유두세포 배양 직후 내지 배양 72시간 이내에, 상기 각질세포를 첨가하여 3차원 공배양하는 것을 특징으로 하는 모낭유사 구조체 형성 방법.

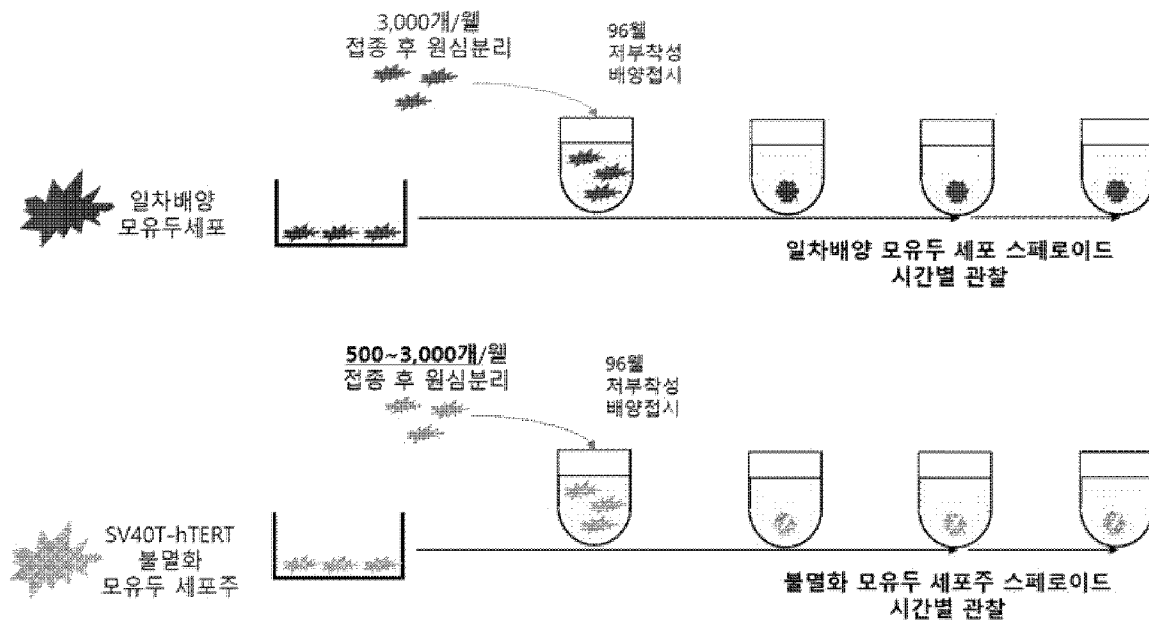
[도1]



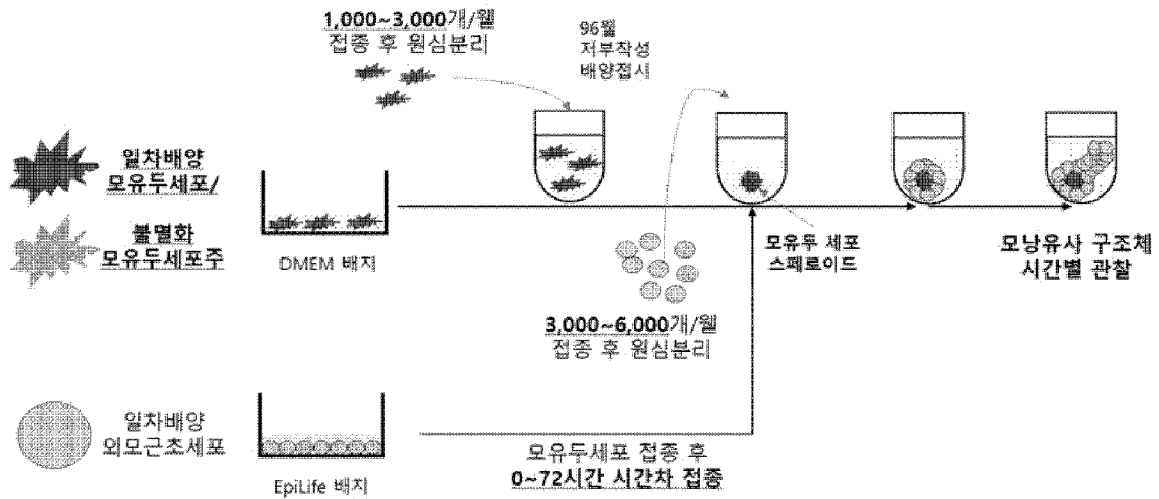
[도2]



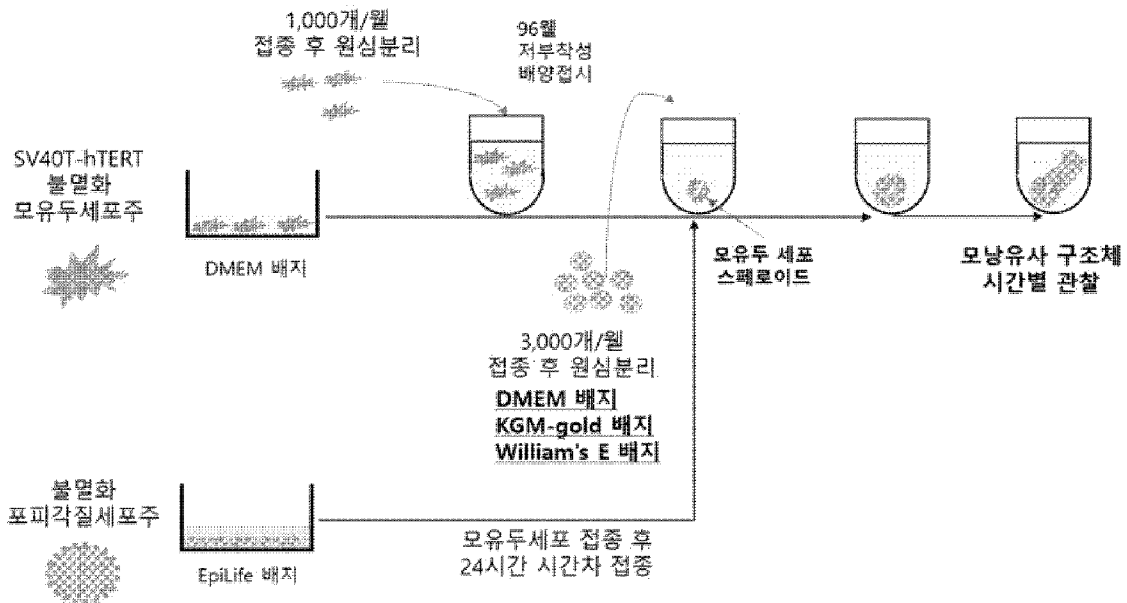
[도3]



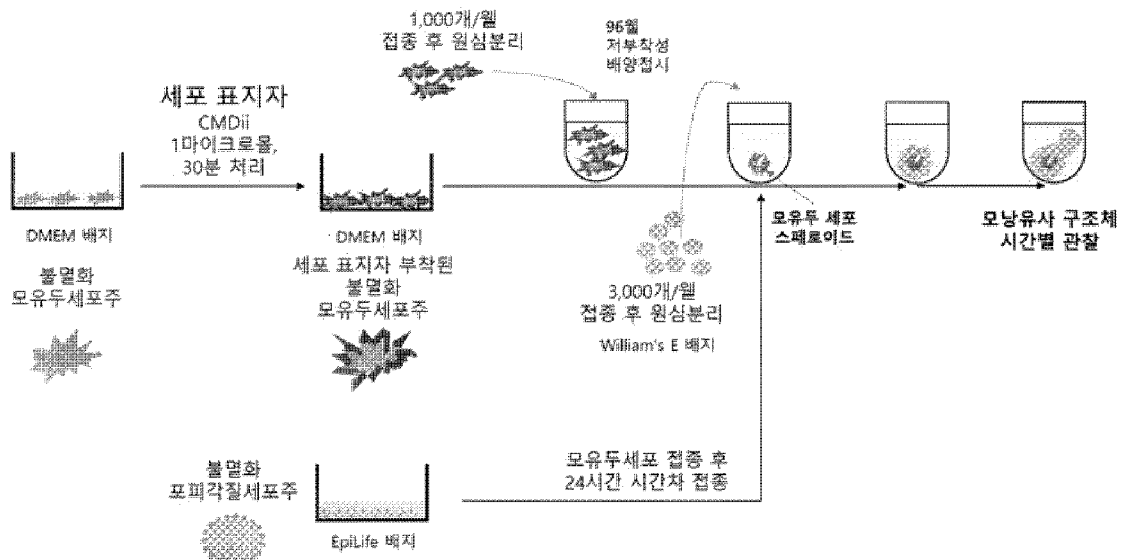
[도4]



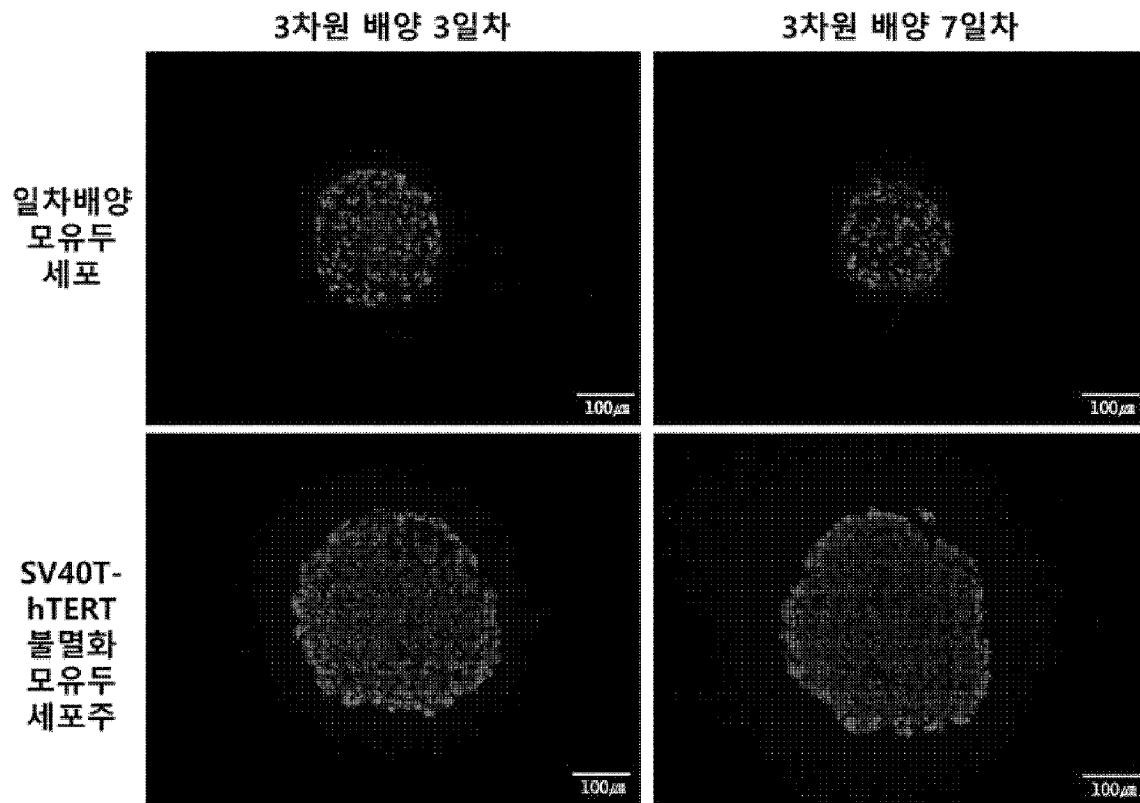
[도5]



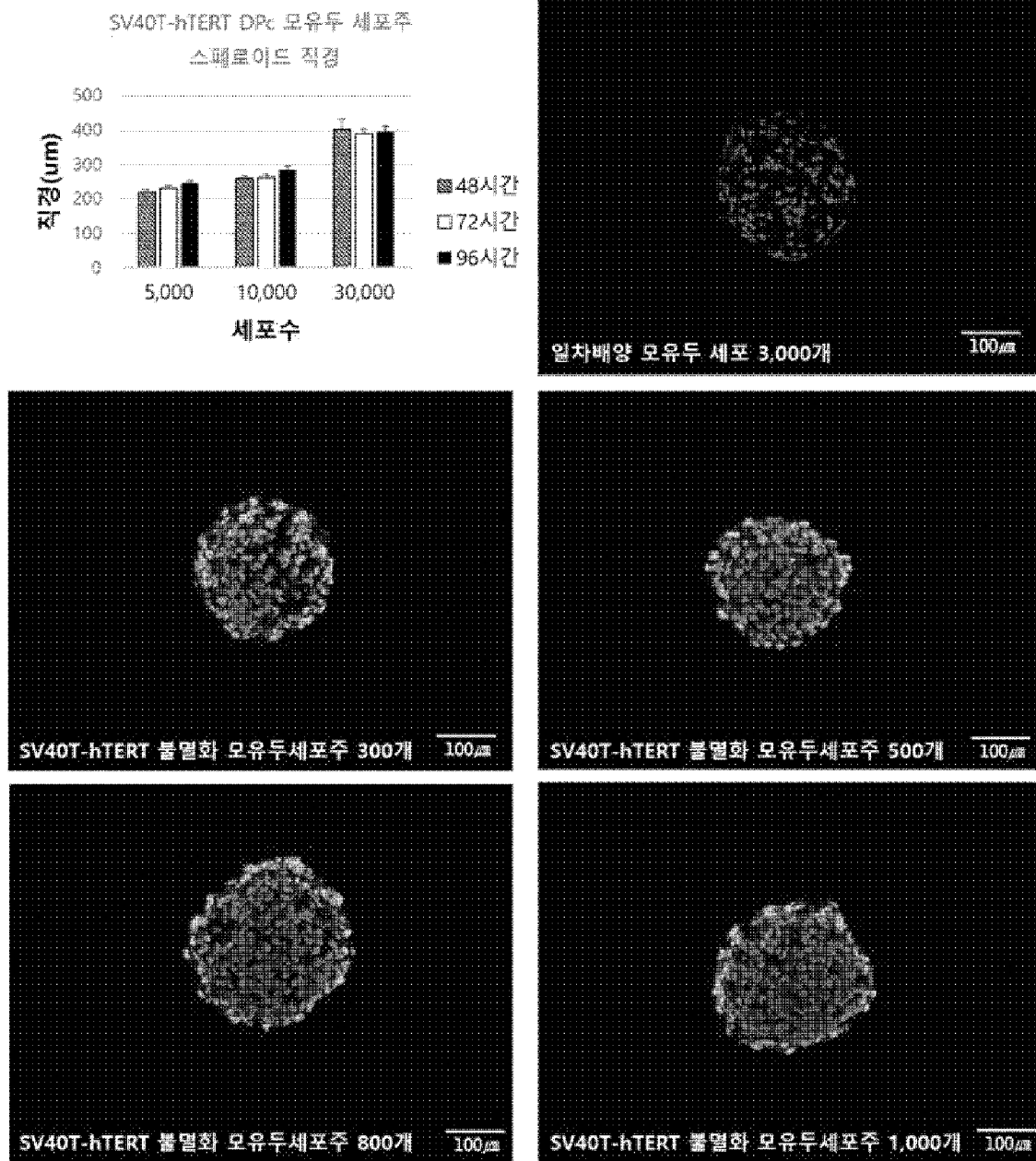
[도6]



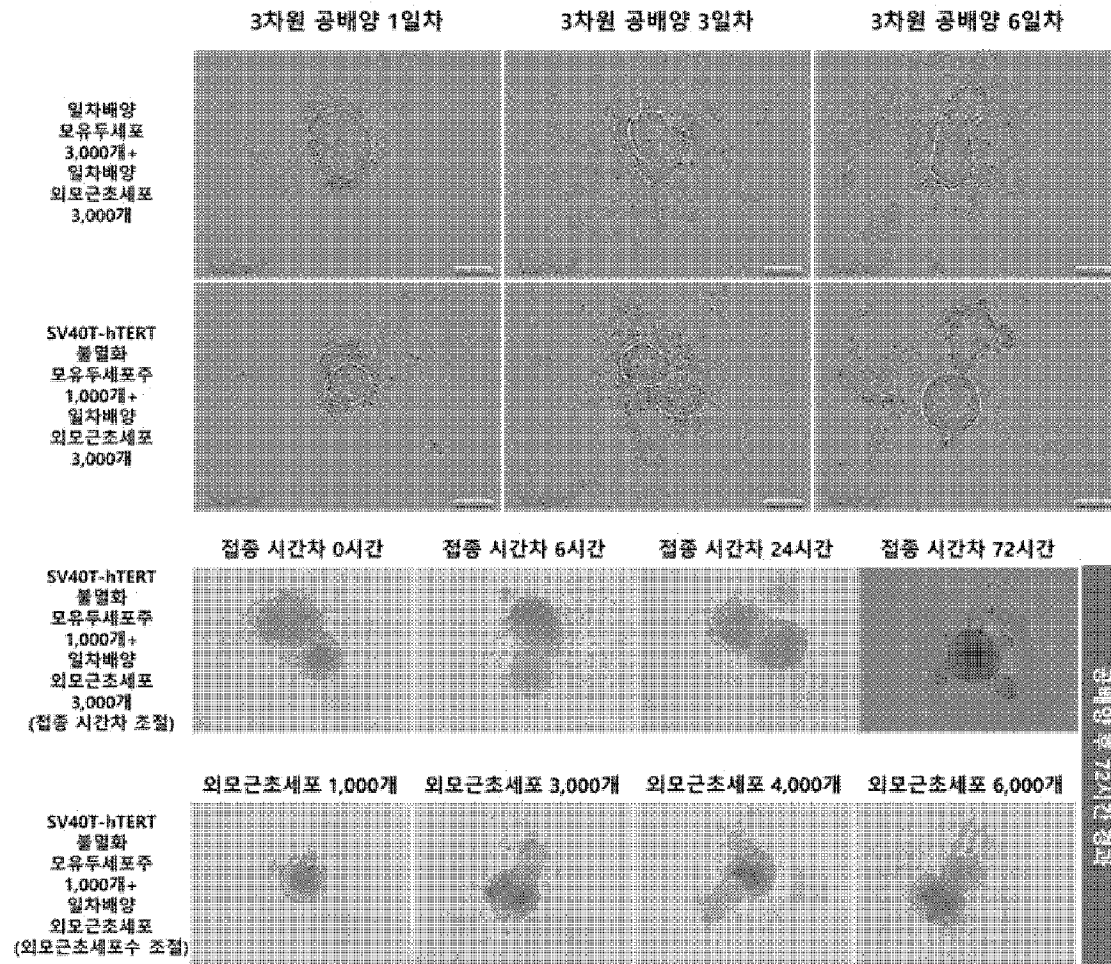
[도7]



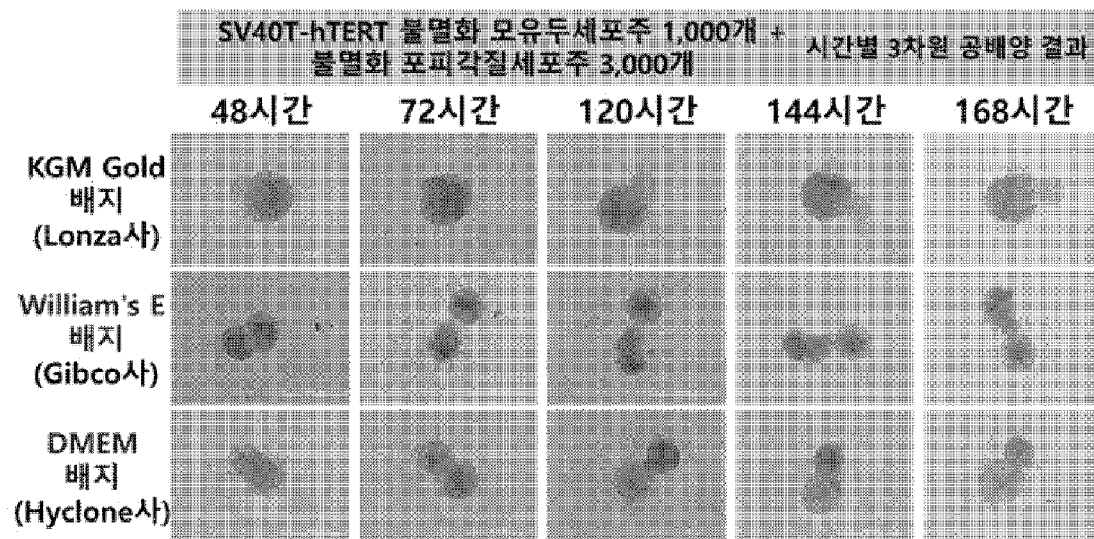
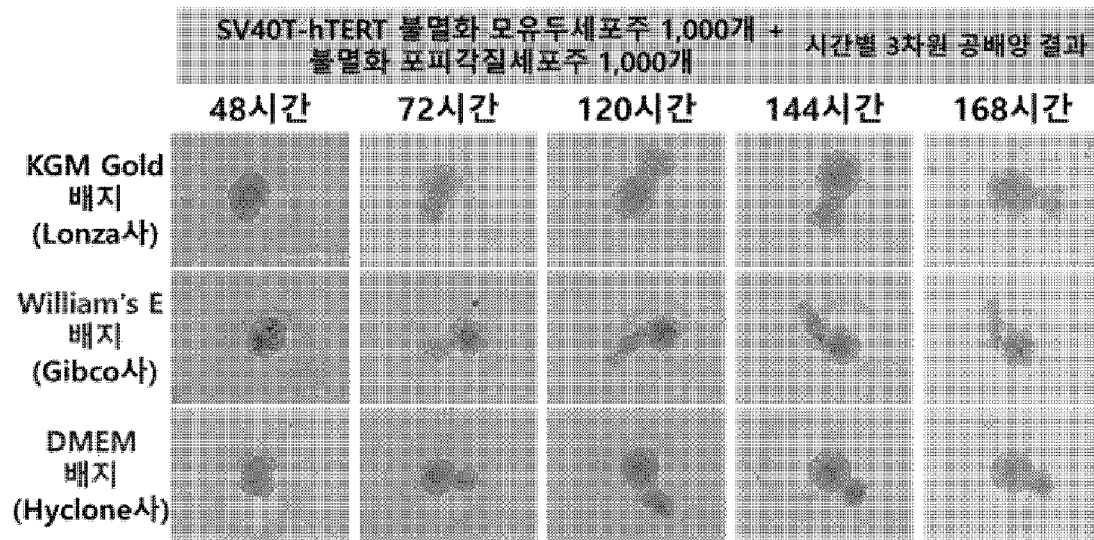
[도8]



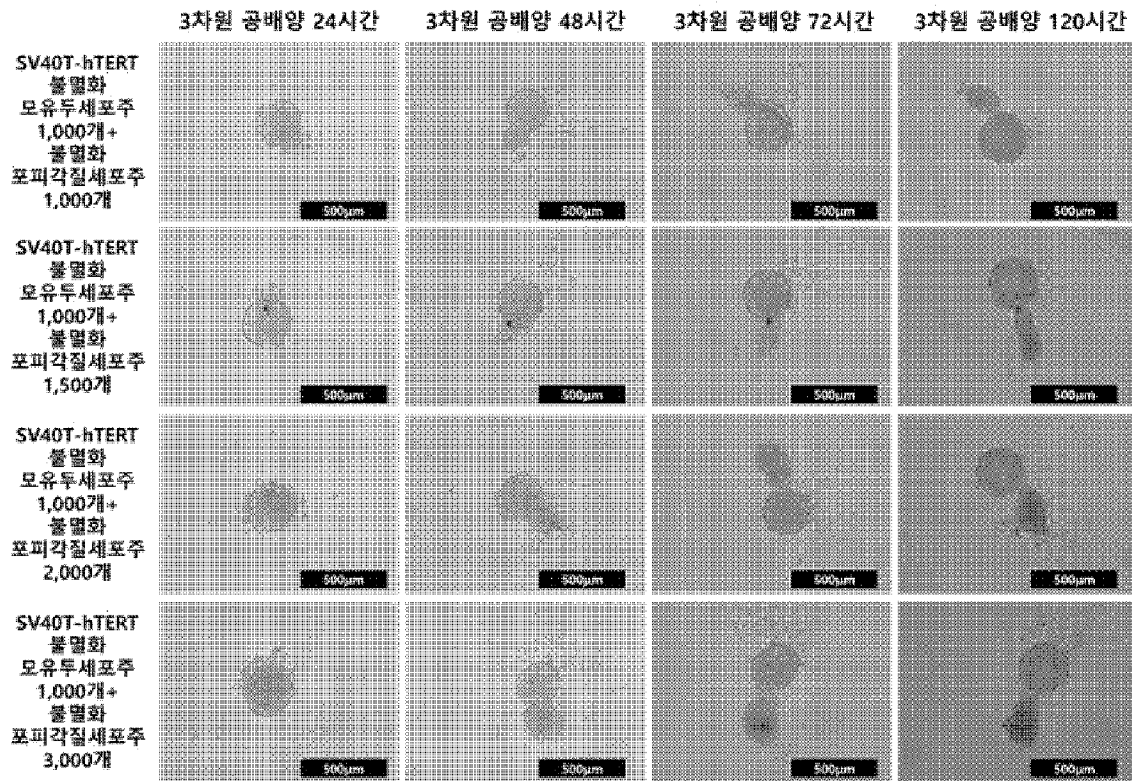
[도9]



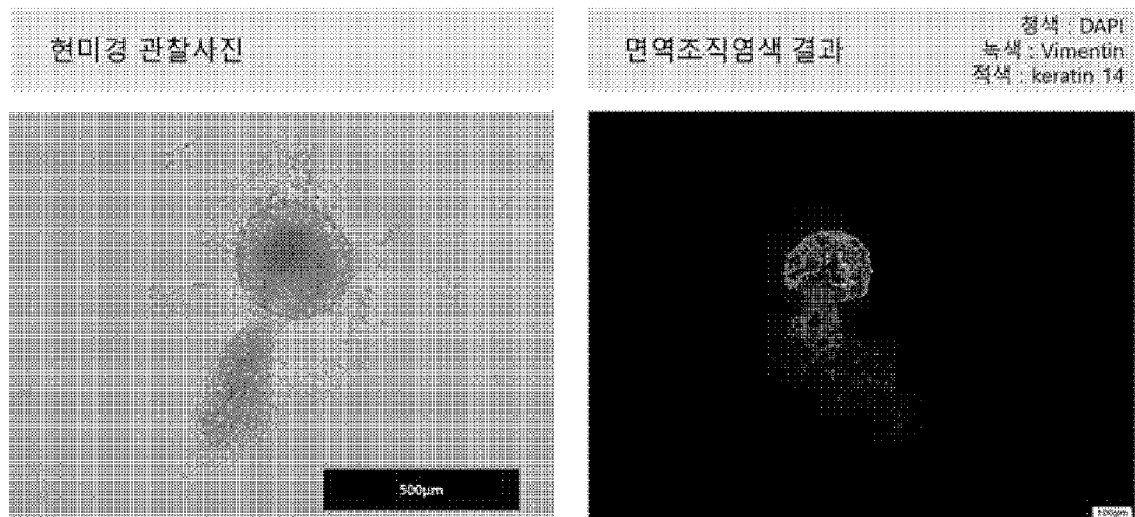
[도10]



[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/071(2010.01)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); A61F 2/10(2006.01); C12N 5/06(2006.01); C12N 5/08(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(hair follicle), 모유두 세포(dermal papilla cell), 각질세포(keratinocyte), 공배양(co-culture), 불멸화(immortalization), SV40T, hTERT, 모낭유사 구조체(hair follicle like structure), 스페로이드(spheroid)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2021-0117985 A (ANK. CO., LTD. et al.) 29 September 2021 (2021-09-29) See claims 8-9, and paragraphs [0022], [0055], [0067] and [0075]-[0076].	1-5
Y	KWACK, M. H. et al. Establishment and characterization of five immortalized human scalp dermal papilla cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018, vol. 496, pp. 346-351. See abstract, pages 347 and 350, and figure 1.	1-5
A	PARK, Gee Ho. Development of de novo human hair microfollicle (hHMF) in vitro with primary cultured dermal papilla cells and outer root sheath cells. 서울대학교 석사학위논문 (thesis, The Graduate School of Seoul National University). 2019, pp. 1-42. See entire document	1-5
A	YANG, Jung Min. Establishment of immortalized human dermal papilla cell lines for hair research. 경북대학교 박사학위논문 (Ph.D. thesis, Kyungpook National University). 2011, pp. 1-31. See entire document	1-5
A	US 2009-0198336 A1 (QIAO, J. et al.) 06 August 2009 (2009-08-06) See entire document	1-5
☒ 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 18 October 2023		Date of mailing of the international search report 20 October 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/009142**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010-021245 A1 (KEIO UNIVERSITY) 25 February 2010 (2010-02-25) See entire document	1-5
A	SHIN, S. H. et al. Establishment and characterization of an immortalized human dermal papilla cell line. BMB reports. 2011, vol. 44, no. 8, pp. 512-516. See entire document	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/009142

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2021-0117985	A	29 September 2021	None			
US	2009-0198336	A1	06 August 2009	EP	2007879	A2	31 December 2008
				JP	2009-529886	A	27 August 2009
				JP	2014-217382	A	20 November 2014
				JP	5615541	B2	29 October 2014
				JP	5844435	B2	20 January 2016
				US	8980628	B2	17 March 2015
				WO	2007-109223	A2	27 September 2007
				WO	2007-109223	A3	08 November 2007
WO	2010-021245	A1	25 February 2010	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/071(2010.01); A61F 2/10(2006.01); C12N 5/06(2006.01); C12N 5/08(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: eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 모낭(hair follicle), 모유두 세포(dermal papulla cell), 각질세포(keratinocyte), 공배양(co-culture), 불멸화(immortalization), SV40T, hTERT, 모낭유사 구조체(hair follicle like structure), 스페로이드(spheroid)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2021-0117985 A (주식회사 에이엔케이 등) 2021.09.29 청구항 8-9, 단락 [0022], [0055], [0067], [0075]-[0076]	1-5
Y	KWACK, M. H. 등, "Establishment and characterization of five immortalized human scalp dermal papilla cell lines", Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 제496권, 페이지 346-351 초록, 페이지 347, 350, 도면 1	1-5
A	박지호, "Development of de novo human hair microfollicle(hHMF) in vitro with primary cultured dermal papilla cells and outer root sheath cells", 서울대학교 석사학위논문, 2019, 페이지 1-42 전체 문헌	1-5
A	양정민, "Establishment of immortalized human dermal papilla cell lines for hair research", 경북대학교 박사학위논문, 2011, 페이지 1-31 전체 문헌	1-5
A	US 2009-0198336 A1 (QIAO, J. 등) 2009.08.06 전체 문헌	1-5
☒ 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 "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 2023년10월18일(18.10.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년10월20일(20.10.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2010-021245 A1 (KEIO UNIVERSITY) 2010.02.25 전체 문헌	1-5
A	SHIN, S. H. 등, "Establishment and characterization of an immortalized human dermal papilla cell line", BMB reports, 2011, 제44권, 제8호, 페이지 512-516 전체 문헌	1-5

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0117985 A	2021/09/29	없음	
US 2009-0198336 A1	2009/08/06	EP 2007879 A2	2008/12/31
		JP 2009-529886 A	2009/08/27
		JP 2014-217382 A	2014/11/20
		JP 5615541 B2	2014/10/29
		JP 5844435 B2	2016/01/20
		US 8980628 B2	2015/03/17
		WO 2007-109223 A2	2007/09/27
		WO 2007-109223 A3	2007/11/08
WO 2010-021245 A1	2010/02/25	없음	