(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0125735
(43) 공개일자 2014년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2006.01) *A61P 17/14* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0045971
(22) 출원일자 2014년04월17일
심사청구일자 2014년04월17일
(30) 우선권주장
1020130043706 2013년04월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
홍성희
서울특별시 중구 왕십리로39길 30, 102동 508호 (신당동, 한진그랑빌아파트)
황인식
서울특별시 성동구 왕십리로33길 12-1 (하왕십리동)
최경아
강원도 철원군 동송읍 금학로62번길 29 (주택)
(74) 대리인
이처영, 장제환

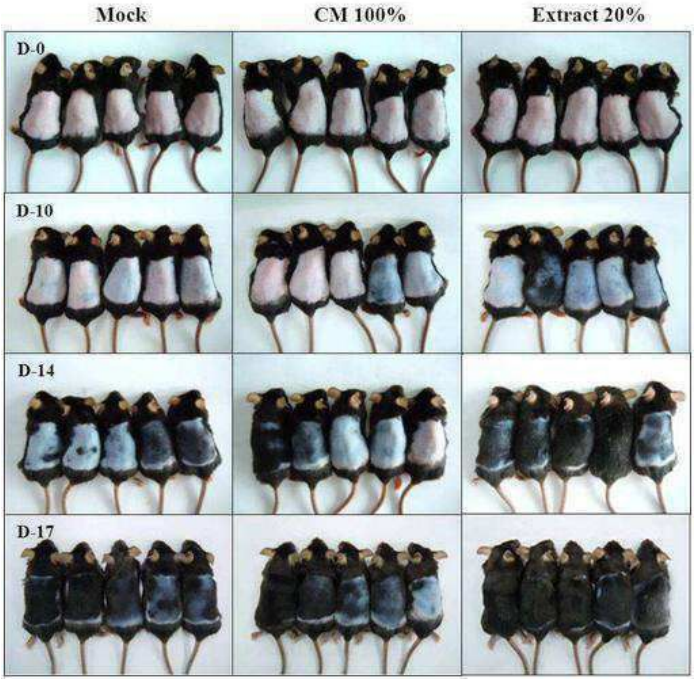
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 인간의 성체줄기세포 중에서 인간 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출한 신경줄기세포 (neural stem cells, NSCs)의 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지에 효과적인 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 우수한 발모촉진 효과를 가지므로 발모촉진 또는 탈모방지에 유용하다.

대 표 도 - 도7b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20120007758
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)일반연구자-기본(유형II)
연구과제명 체세포의 신경세포 유도 및 세포치료제 개발연구
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012050131
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.10.01 ~ 2013.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 추출물은 15 내지 25%(v/v)으로 함유되는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 추출물은 모유두 세포에서 성장인자, 렙틴(leptin) 및 Shh(Sonic hedgehog)의 발현을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 성장인자는 혈관내피세포 성장인자(VEGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF), 간세포 성장인자(HGF) 또는 각질세포 성장인자(KGF)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 추출물은 모유두 세포에서 TGFβ-1 또는 IL-6의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 추출물은 모낭내 줄기세포를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 줄기세포를 활성화는 BMP2, BMP4 또는 BMP6의 발현 억제 및 Tmeff1 또는 TGF-2의 발현 증가를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물인 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 탈모치료제.

청구항 11

(a) 신경줄기세포를 배양하는 단계; 및

(b) 단계 (a)의 신경줄기세포 배양액으로부터 신경줄기세포 추출물을 분리하는 단계를 포함하는, 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단계 (a)의 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 단계 (a)는 N-2 첨가제, 헤파린, 섬유아세포 성장인자(bFGF), 표피성장인자(EGF), 및 백혈병 억제인자(LIF)가 포함된 인간 신경구 배양 배지(human neurosphere culture media)에서 10-14일간 배양 후, 불멸화하여 얻은 세포를 DMEM(Dulbecco's Moeifiee Eagle's Meeium), 10% FBS(fetal bovine serum), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 비유도성 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물의 새로운 용도에 관한 것으로, 인간 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 배양하여 제조된 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 머리털은 일정한 모주기(Hair cycle)를 가지며, 모유두 주위에 있는 모모세포(keratinocyte)가 분열 증식하는 기간을 성장기라 하며 모발의 성장이 멈추고 모유두에서 분리되는 시기인 퇴화기를 거쳐 모모세포가 성장하지 않고 있다가 일정기간 후에 빠지게 되는 휴지기를 거치게 된다. 모주기는 이런 성장기, 퇴화기, 휴지기, 및 성장기 과정을 되풀이하게 된다. 보통 성인의 모발 성장기는 개인차가 있지만 일반적으로 남성이 3~5년, 여성이 4~6년이며 모발의 약 15%가 퇴화기와 휴지기인 것으로 알려져 있다. 사람의 모발은 각각 독립된 성장주기를 가지며, 한쪽에서는 빠지고 또 다른 쪽에서는 나서 전체적으로 동일한 모발수를 유지하고 있으며 이를 생리적 자연탈모라고 한다. 그러나 정상적인 성장주기의 휴지기 외에도 질병, 헤어제품(젤, 왁스 등), 스트레스 등으로 탈모현상이 발생되기도 하나 이러한 경우는 원인이 제거되면 다시 회복된다.

[0003] 대머리는 머리털이 빠져서 나지 않는 것이 아니고 점차 가늘어져 솜털로 되는 것이고, 진행되면서 모근에 존재하는 모유두가 작아진다. 모유두가 작아지면 머리털의 굵기도 가늘어지면 동시에 모주기도 짧아지며 새로 자라나온 털은 더욱 가늘어진다. 대머리가 계속 진행되면 머리털은 솜털로 변하며 모주기는 더욱 짧아져 조금 자란 후 빠진다. 또한 자가 면역 질환으로 발생된다고 알려진 원형 탈모증과 내분비 질환, 영향 결핍, 약물, 출산 등

신체적, 정신적 스트레스 후 발생하는 일시적인 탈모와 반대로, 흔히 알고 있는 대머리는 유전되는 경향이 있으며 머리가 벗겨지는 정도도 다양하고 체내 혈중 남성 호르몬(안드로겐, androgen)과 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] 현재 탈모초기에는 국소 도포제인 미녹시딜과 경구용 약제인 프로페시아(finasteroid 성분)를 사용하면 더 이상의 진행은 어느 정도 늦출 수 있는 것으로 알려져 있으나, 이미 진행된 탈모에 대해서는 정상으로 회복하는데 어려움이 있으며 이런 경우는 모발이식을 고려해 볼 수 있다. 모발이식은 호르몬의 감수성이 적어 탈모의 영향이 덜한 귀 윗부분의 옆머리와 뒷머리부분의 모발을 평균 1000~3000모 전후로 절개법(또는 비절개법)을 이용하여 채취하고 이를 이식하는 방법이 있으나 이 또한 횟수에 제약이 있다.

[0005] 현재 시판되고 있는 제품은 탈모방지 효과는 알려져 있으나 발모와 관련되어서는 미미한 효과를 보인다. 또한 사용시 중단하면 다시 문제가 생기고, 비용적인 측면에서도 부담이 된다.

[0006] 최근 유전자를 이용한 탈모 치료 방법 및 줄기세포를 이용한 탈모 치료 방법이 개발되고 있다. 본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 등록특허 10-0771171(2007.10.29)에는 모낭 줄기세포를 분리, 증식하여, 모낭 세포로 분화시키는 방법 및 대머리 치료용 조성물에 대해 기재되어 있고, 대한민국 공개특허 10-2008-0097593(2008.11.06.)에는 지방조직 유래 줄기세포 및 모낭세포를 적절히 혼합하여 조성된 세포치료제에 대해 기재되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허 10-1218101(2013.01.03.)에는 양수 내 태아 유래 중간엽 줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발모촉진 또는 탈모 방지용 조성물에 관해 기재되어 있다. 그러나, 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 이용한 우수한 효과의 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 인간의 모유두 세포(human dermal papilla cells; hDPCs)에 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 적용하여 그 특징을 규명하고, in vivo에서 C57BL/6 마우스를 이용하여 발모 촉진 또는 탈모방지 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0771171(2007.10.29)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2008-0097593(2008.11.06.)

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 10-1218101(2013.01.03.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 신경줄기세포를 이용한 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 신경줄기세포를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 신경줄기세포 배양액으로부터 신경줄기세포

추출물을 분리하는 단계를 포함하는, 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 발모촉진 효과가 우수한 것으로 확인되었다. 특히 본 발명에 의한 조성물은 다양한 모발성장에 관련된 성장인자 및 Shh (Sonic hedgehog)를 조절함으로써 좀 더 원천적으로 발모촉진 효과를 나타낸다.

[0015] 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물, 또는 여기서 분리한 특정인자(들)을 발모촉진 관련 의약외품 등의 원료로 사용할 수 있어, 본 발명은 발모촉진, 탈모방지 및 대머리치료 관련 분야에서 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 전체 단백질 함량을 Brad-ford assay를 통해서 확인한 결과이다.

도 2a ~ 도 2b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 모유두 세포에 처리 시 세포독성 및 세포 형태를 WST-1 분석 및 위상차현미경으로 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 모유두 세포에 처리 시 모유두 세포의 증식을 WST-1 분석으로 확인한 결과이다.

도 4a ~ 도 4e는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 모유두 세포에 처리 시 다양한 성장인자(VEGF, IGF, HGF, KGF) 및 사이토카인(Wnt5a, BMP2, TGF-beta2 등) 발현이 증가됨을 qRT-PCR 및 RT-PCR로 확인한 도면이다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물에 의해 모발의 성장기를 유도하는 렙틴(leptin)과 사이토카인인 Shh(Sonic hedgehog)의 발현량이 증가함을 qRT-PCR로 확인한 도면이다

도 6a 및 도 6b는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물에 의해 모발의 퇴화기를 유도하는 TGF-β1(Transforming growth factor bata 1)의 발현과 IL-6의 발현이 저해됨을 qRT-PCR로 확인한 도면이다.

도 7a 및 도 7b는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 일정기간 도포 시 발모가 촉진됨을 확인한 사진이다.

도 8a ~ 도 8c는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 일정기간 도포 후에 발모가 촉진됨을 털의 길이 및 중량으로 확인한 그림 및 도표이다.

도 9a 및 도 9b는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 도포 후 모공의 성장이 유도되었음을 H&E (Hematoxylin and eosin)를 통해 확인한 결과이다.

도 10a 및 도 10b는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 도포 후 세포의 성장이 증가되었음을 조직면역형광법(Immunohistochemistry)을 통해 확인한 결과이다.

도 11은 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 도포 후 조직 내에서 모유두 세포의 마커인 Alkaline phophatase (Akp)의 발현량이 증가함을 qRT-PCR로 확인한 결과이다.

도 12는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 도포 후 조직 모공내 줄기세포의 분화를 억제하는 BMP family의 발현량이 감소함을 qRT-PCR로 확인한 결과이다.

도 13은 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 도포 후 조직 모공내 줄기세포의 분화를 억제하는 BMP의 발현을 억제하는 Tmeff1의 증가 및 상기 Tmeff1의 발현을 증가시키는 TGFβ-2의 증가를 qRT-PCR로 확인한 결과이다.

도 14는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을, 털을 제거한 마우스에 도포 후 조직 모공내 BMPs의 감소로 인한 줄기세포(CD34+)의 분화정도를 조직면역형광법(Immunohistochemistry)을 통해 확인

한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 일 관점에서, 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진용 또는 탈모방지용 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에서, 상기 조성물을 제조하기 위한 신경줄기세포는 그 종류에 제한을 받지 않는다. 바람직하게는 태아에서 유래한 성체 줄기세포이고, 본 발명의 구체적인 실시 예에서는 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포를 이용하여 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 제조하였다.

[0019] 본 발명에서, '신경줄기세포 배양액'은 외배엽 줄기세포의 일종인 신경줄기세포를 계대배양하여 수득한 배지내에 포함된 구성 성분을 포함하는 물질이고, '신경줄기세포 추출물'이란 외배엽 줄기세포의 일종인 신경줄기세포를 계대배양하고 신경줄기세포 배양액을 수득하여 원심분리하여 상등액을 여과하고, 이때 분리된 침전물을 호모게나이저(homogenzer)로 균질화하여 제조된 혼합물을 원심분리하여 얻은 상등액으로 수득한 세포내에 포함된 구성 성분을 포함하는 물질이다 (실시예 1 참조).

[0020] 본 발명에서 신경세포 추출물은 세포독성을 나타내지 않는 범위의 유효 농도로 10~30%(v/v)으로 함유될 수 있으며, 바람직하게는 15~25%(v/v)이고, 가장 바람직하게는 20%(v/v)로 함유될 수 있다.

[0021] 본 발명의 구체적인 실시 예에서는 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물이 발모촉진 기능을 활성화시키는가를 확인하기 위하여, 신경줄기세포 배양액(Conditioned medium; CM) 및 추출물(Extract; Ext.)에서 얻은 전체 단백질을 Brad-ford assay를 통해서 확인하였다 (도 1).

[0022] 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 모유두 세포(Dermal Papilla cells)에 3일동안 처리후, 세포독성을 WST-1 분석으로, 세포형태를 위상차현미경을 통해서 확인하였다 (도 2a ~ 도 2b).

[0023] 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 모유두 세포(Dermal Papilla cells)에 처리 후, 24시간 단위로 최대 72시간 동안 모유두 세포의 증식을 WST-1 분석을 통해서 확인하였다 (도 3).

[0024] 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 세포내의 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 발모 촉진 기능을 수행하며, 바람직하게 발모 촉진을 결정하는 모유두 세포(Dermal Papilla cells)에서 모발 성장에 관여하는 다양한 성장인자 (growth factor) 분비를 유도함을 확인하였다 (도 4a ~ 도 4e). 상기 모발 성장 인자는 VEGF, IGF, HGF, 및 KGF로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함한다.

[0025] 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 세포내의 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 발모 촉진 기능을 수행하며, 바람직하게 발모 촉진을 결정하는 모발의 성장기를 유도하는 사이토카인인 Shh(Sonic hedgehog) 발현을 촉진시킴을 확인하였다 (도 5a 및 도 5b).

[0026] 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 대조군에서와 달리 모발의 퇴화기를 유도하는 TGF-β1(Transforming growth factor bata 1)의 발현을 저해시킴을 확인하였다 (도 6a 및 도 6b).

[0027] 본 발명의 구체적인 실시 예에서는 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물이 발모촉진 기능을 활성화시키는가를 확인하기 위하여, 털을 제거한 C57BL/6 마우스의 등에 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 다양한 농도로 처리하였다. 그 결과 대조군(Mock)과 달리 신경줄기세포 배양액(Conditioned medium; CM) 처리군 및 신경줄기세포 추출물(Extract; Ext.) 처리군에서 발모의 증가가 유도됨을 확인하였다 (도 7a 및 도 7b).

[0028] 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 처리군에서 대조군과 달리 모발의 성장기가 유도되며, 전반적인 발모의 길이와 발모의 양 또한 증가됨을 확인하였다 (도 8a ~ 도 8c).

[0029] 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 처리군에서 대조군과 달리 같은 시간동안 활성화되는 모공의 숫자가 많아지는 것을 확인하였다 (도 9a 및 도 9b).

[0030] 대조군과 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 처리군에서 세포증식을 나타내는 마커인 Ki-67을 확인한 결과, 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 도포한 군에서 세포증식이 활성화되었고, 세포사멸도 일어나지 않음을 확인하였다 (도 10a 및 도10b).

[0031] 또한 대조군과 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 처리군에서 조직내에서 모유두 세포의 마커인

alkaline phosphatase (Akp) mRNA 발현량의 증가를 확인하였다 (도 11).

[0032] 대조군과 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 처리군에서 모공내 줄기세포 (bulge stem cells)의 분화를 억제하여 모발성장에 억제하는 물질로 알려진 BMP (Bone morphogenetic proteins) family의 발현량을 확인한 결과, 대조군(Mock) 및 신경줄기세포 배양액(Conditioned medium; CM) 처리군과 달리 신경줄기세포 추출물(Extract; Ext.) 처리군에서 발현량이 감소됨을 확인하였다 (도 12).

[0033] 대조군과 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 처리군에서 BMPs 발현을 억제하는 Tmeff1 및 Tmeff1를 증가시키는 TGFβ-2 (Transforming growth factor bata 2)의 mRNA 발현량을 확인한 결과, 신경줄기세포 추출물(Extract; Ext.) 처리군에서 Tmeff1 및 TGFβ-2의 발현량이 증가됨을 확인하였다 (도 13a 및 도 13b).

[0034] 대조군과 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 처리군에서 BMPs의 발현 감소로 인한 줄기세포(CD34+)의 분화정도를 확인한 결과, 신경줄기세포 추출물(Extract; Ext.) 처리군에서 줄기세포가 활성화됨을 확인하였다 (도 14).

[0035] 본 발명의 신경줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, a-MEM(a-Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 DMEM 배지일 수 있다.

[0036] 상기 기본 배지에는 0.01 ~ 15%(v/v)의 FBS를 포함하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 10% FBS가 첨가된 배지에서 배양된 신경줄기세포를 이용하여 모발성장효과를 측정하였다.

[0037] 본 발명에 있어, '발모촉진 또는 탈모방지용 조성물'은 상기 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 포함하는 조성물로서 그 제형은 어떠한 형태라도 가능하다. 이러한 제형의 예로 상기 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물을 이용하여 제조된 형태는 용액, 겔, 크림류, 로션류, 파우더, 화장수류, 파운데이션류 및 고체화된 비누류 등일 수 있다. 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이러한 제형 중 어떠한 형태로도 제조되어 상용화될 수 있으며, 상기 예들에 한정되지 않는다. 본 발명의 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분 이외에 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0038] 나아가, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 함유하는 발모촉진 또는 탈모방지용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 이에 한정되는 것이 아니며 1일 당 0.01-2000 mg/kg(체중)일 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 발모촉진 또는 탈모의 예방 및 치료에 사용되기 때문에 피부에 국소적으로 적용되는 방식으로 투여되는 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는

유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발모촉진" 또는 "탈모방지"는 당업계에서 이용되는 다른 용어 양모 또는 육모 촉진을 포함하는 의미이다.

[0044] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 부위는 두피뿐만 아니라 발모를 필요로 하는 신체 부위라면 어디나 적용할 수 있다. 예를 들면, 외상으로 인한 흉터로 모발 또는 털이 손상된 부위 또는 단순 미용효과를 목적으로 하는 넓은 이마 또는 M형 이마, 속눈썹 또는 눈썹 및 무모증의 상태 호전에도 사용할 수 있다.

[0045] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 신경줄기세포를 배양하는 단계 및 (b) 상기 신경줄기세포 배양액으로부터 신경줄기세포 추출물을 분리하는 단계를 포함하는 발모촉진 또는 탈모방지용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0046] 상기 조성물의 제조는 통상적으로 사용되는 어떠한 방법으로도 제조될 수 있으며, 신경줄기세포 추출물을 분리하는 과정은 본 발명의 방법에 한정되지 않고 당업계에서 통상적으로 수행되는 방법으로 실시가능하다. 예를 들어 배양 중인 신경줄기세포를 트립신(Trypsin-EDTA)으로 처리하여 계대 배양하고 신경줄기세포 배양액을 수득하여 원심분리하여 상등액을 여과하고, 이때 침전물 세포를 호모게나이저로 균질화한 후 원심분리하여 상등액을 수득하여 신경줄기세포 추출물을 제조할 수 있다. 상기 신경줄기세포 추출물인 상등액에는 세포내에 포함된 구성성분이 포함되어 있다. 신경줄기세포 추출물 분리 단계에서 기존의 추출물 제조 기술을 이용하여 당업자가 용이하게 신경줄기세포 추출물의 농도를 조절할 수 있는 것은 자명하다.

[0047] 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는, 상기 단계 a)에서 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포를 불멸화시켜 얻는 세포이다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 단계 a)에서 신경줄기세포는 0.01 ~ 15%(v/v)의 FBS를 포함하는 배지에서 배양한다. 본 발명의 구체적인 실시 예에서는 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 이용하고 이를 불멸화(immortal)시켜 세포를 얻었다. 상기 불멸화는 세포배양조건 하에서 동물세포가 반영구적인 증식활성을 획득하여 사멸하는 일 없이 계속 증식하게 되는 상태를 말하며, 본 발명의 속하는 기술 분야에서 공지된 기술을 이용하여 불멸화시킬 수 있다. 상기 불멸화된 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 및 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하여 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하고 이를 원심분리하여 상등액을 여과하였으며, 신경줄기세포 추출물은 트립신(Trypsin-EDTA) 과정으로 얻은 세포를 균질화(homogenzization)를 통해서 수득하였다.

[0048] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 발모를 촉진하거나 탈모를 예방 내지 치료할 수 있는 의약(외)품 개발의 원료로 유용하게 사용될 수 있다.

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예만 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0050] **<실시예 1> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 생산**

[0051] 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 불멸화(immortal)시켜 세포를 얻었다. 구체적으로는, 14주 된 태아 신경 세포 조직(neural cell tissue)을 0.1% collagenase와 0.1% hyaluronidase 용액을 37℃에서 1시간 동안 처리하고 0.05% Trypsin-EDTA 2-3분 처리하여 single cells로 분리한 후, markers (CD45-/CD133+/CD34-)를 이용하여 FACS로 분리하였다. 이를 N-2 supplements, 0.2mg/ml hlearin, 20ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factors), 20ng/ml EGF (Eeielrmal Growth Factor), 그리고 10ng/ml LIF가 첨가된 인간 신경구 배양 배지(human neurosphere culture media)에 배양하였다.

[0052] 10-14일 경과 후, 형성된 neurospheres에 collagenase를 처리하여 single cells로 분리하고 레트로바이러스매개체(retroviral vector)를 이용하여 v-myc 유전자를 형질도입(transeuction)하고 선별(selection)과정에서 얻

은 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하였다 (Engraftable human neural stem cells respond to elvelopmental cues, replace neurons, and espress forevel genes., Flax JD *et al., Nature Biotechnology*, vol.16, 1998; Neuroprotective effect of neural stem cell-contionee meeia in *in vaxro* moeel of Huntington's disease., Lim H-C *et al., Neuroscience Letters* 435, pp175-180, 2008).

[0053] 150mm 배양 접시(culture dishes)에 상기 세포를 $5X10^5$을 분주하고, 배양배지(culture meeium) 15ml 첨가 후 37℃, 5% CO_2 Incubator에서 80% confluence시에 배양액을 수득하였다. 이때, 배양배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지였고, 배양 후 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 계대 배양하는 과정에서 배양액을 수득하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 여과하였으며, 신경줄기세포 추출물은 PBS로 두 번 세척한 후 트립신(Trypsin-EDTA) 과정으로 얻은 세포를 3차 증류수 100ml을 넣고 호모게나이저(homogenizer)로 6,000RPM에서 5분 동안 균질화(homogenzization)하고 이를 원심분리(1500rpm, 5분)하여 상등액을 수득하였다.

[0054] **<실시예 2> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 전체 단백질량**

[0055] 96-웰플레이트(96-well plate)에 단백질양이 10~100㎍이 되도록 시료를 넣고 전체 부피를 100㎕로 맞추었다. 이때 Blank로는 100㎕의 증류수만 넣었다. 이후 염색약인 코마시블루 (Coomassie blue)를 넣고 마이크로플레이트 판독기 (microplate reader)를 이용하여 595nm에서 측정하였다.

[0056] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 전체 단백질 함량이 높게 측정되었다.

[0057] **<실시예 3> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 세포독성 및 세포증식 측정**

[0058] 96-웰플레이트(96-well plate)에 웰(well)당 $1X10^3$ 개의 세포를 접종하고, 그 다음날 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물을 각각 0% ~ 100% (배양액만 해당)씩 100㎕로 맞추어 처리하였다. 24시간 단위로, assay(WST-1) 물질을 웰(well)당 10㎕ 씩 첨가하고, 인큐베이터에서 반응시킨다. 이후 마이크로플레이트 판독기 (microplate reader)를 이용하여 440nm에서 측정하였다.

[0059] 그 결과, 도 2a 및 도 3에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 세포독성 및 세포증식이 측정되었다.

[0060] **<실시예 4> 정량적 RT-PCR(Quantitative RT-PCR)을 통한 모발 성장인자 및 사이토카인의 발현량 확인**

[0061] 이 실험을 위하여 모유두세포를 24-웰플레이트(24-well plate)에 웰(well)당 $1.5X10^4$ 개의 세포를 접종하고, 그 다음날 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물을 각각 0% ~ 100% (배양액만 해당)씩 처리하였다. 72시간 처리 후 인산화 완충용액(PBS)으로 씻어주고 트리졸 시약(Trizol reagent)를 이용하여 전체 RNA(total RNA)를 얻은 다음 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하고 quantitative RT-PCR을 수행하였다.

[0062] 그 결과, 도 3a ~ 도 6b에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 처리군에서 모발성장에 관여하는 VEGF, IGF, HGF, KGF 성장인자 또는 모발의 성장기를 유도하는 Shh의 발현량이 높게 나왔으며, 또한 퇴화기를 유도하는 TGF-β1은 적게 발현됨을 보였다.

[0063] **<실시예 5> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 도포한 C57BL/6J 피부조직에서의 모발성장촉진 효과 확인**

[0064] 5주령 C57BL/6J 마우스(mice)를 24±2℃에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(100%, v/v)과 신경줄기세포 추출물(20%, v/v)을 1ml 처리하였다. 대조군으

로는 complete culture media (DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리후 일정기간마다 모발을 확인하여 최대 16일 후 마우스의 모발성장촉진 효과를 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포 추출물(20%, v/v) 및 신경줄기세포 배양액이 대조군에 비해서 모발성장촉진 효과가 있음을 보였다.

[0066] **<실시예 6> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 도포한 C57BL/6J 피부조직에서의 모발성장촉진 효과 분석**

[0067] **1. 털의 길이 및 중량 분석**

[0068] 5주령 C57BL/6J 마우스(mice)를 24±2℃에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(100%, v/v)과 신경줄기세포 추출물(20%, v/v)을 1ml 처리하였다. 대조군으로는 complete culture media (DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리 후 일정기간마다 모발을 확인하여 최대 16일 후 마우스를 희생 (sacrifice) 시키고, 모발성장촉진 효과를 위해 털의 길이와 중량을 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 8a ~ 도 8c에 나타난 바와 같이, 발모시기 및 길이, 중량 면에서 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 (20%, v/v) 처리군에서 모발성장촉진 효과가 있으며, 특히 신경줄기세포 추출물 처리군에서 효과가 크다는 것을 확인하였다.

[0070] **2. 조직 H&E 염색**

[0071] 5주령 C57BL/6J 마우스(mice)를 24±2℃에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(100%)과 신경줄기세포 추출물(20%)을 1ml 처리하였다. 대조군으로는 complete culture media (DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리 후 일정기간마다 모발을 확인하여 최대 16일 후 마우스를 희생 (sacrifice) 시키고, 모발성장촉진 효과를 위해 모공의 숫자를 확인하였다.

[0072] 그 결과, 도 9a ~ 도 9b에 나타난 바와 같이, 발모시기 및 모공의 숫자에서 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 (20%, v/v) 처리군에서 모발성장촉진 효과가 있으며, 특히 신경줄기세포 추출물 처리군에서 효과가 크다는 것을 확인하였다.

[0073] **3. 세포성장 마커 분석**

[0074] 5주령 C57BL/6J 마우스(mice)를 24±2℃에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(100%, v/v)과 신경줄기세포 추출물(20%, v/v)을 1ml 처리하였다. 대조군으로는 complete culture media (DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리 후 일정기간마다 모발을 확인하여 최대 16일 후 마우스를 희생 (sacrifice) 시키고, 그 피부조직을 4 % 포름알데하이드에 고정하고, 조직의 파라핀 제작 후, 3㎛ 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙이고 파라핀 제거 및 재수화 과정(deparaffinize and rehydrate)을 실시하였다. 이 후 항체 회수(antigen retrieval; citrate buffer, pH 6.0)하고, 0.1% 트리톤(Triton) X-100을 처리하고 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum)을 블록킹(blocking)을 거치고 1차 항체를 1:250으로 24시간 처리하였다. 이후 2차 항체를 이용하여 1시간 동안 처리하고 DAPI 염색을 5분간 진행하였다. 벡타실드 마운팅(vectashield mounting medium)제를 이용하여 슬라이드에 고정시킨 후 공초점 현미경(Confocal Microscope)으로 결과를 확인하였다.

[0075] 그 결과, 도 10a 및 도 10b에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 (20%, v/v)에서 세포성장을 나타내는 마커인 Ki-67이 증가됨을 확인하였다.

[0076] **4. 조직내 유전자 발현 분석**

[0077] 5주령 C57BL/6J 마우스(mice)를 24±2℃에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(100%, v/v)과 신경줄기세포 추출물(20%, v/v)을 1ml 처리하였다. 대조군으로는 complete culture media (DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리 후 일정기간마다 모발을 확인하여 최대 16일 후 마우스를 희생 (sacrifice) 시키고, 그 피부조직을 트리졸 시약(Trizol reagent)를 이용하여 전체

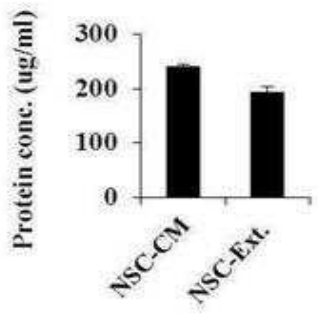
RNA(total RNA)를 얻은 다음 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하고 quantitative RT-PCR을 수행하였다.

[0078] 그 결과, 도 11 및 도 14에 나타난 바와 같이, 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물 (20%)에서 모유두세포 마커인 alkaline phosphatase 증가 및 모공내 증가된 Tmeff1 및 TGFβ-2를 통해 줄기세포의 분화를 억제하는 BMPs 발현이 감소시켜 줄기세포(CD34+)의 활성화되었음을 확인하였다.

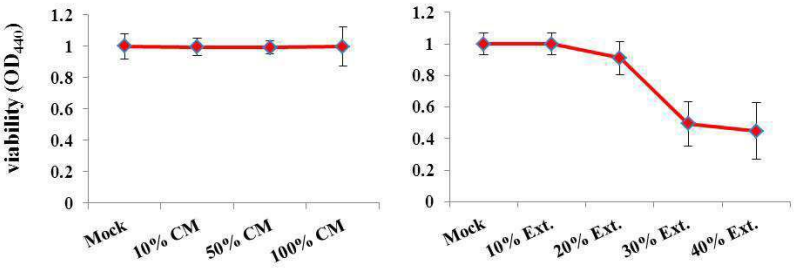
[0079] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

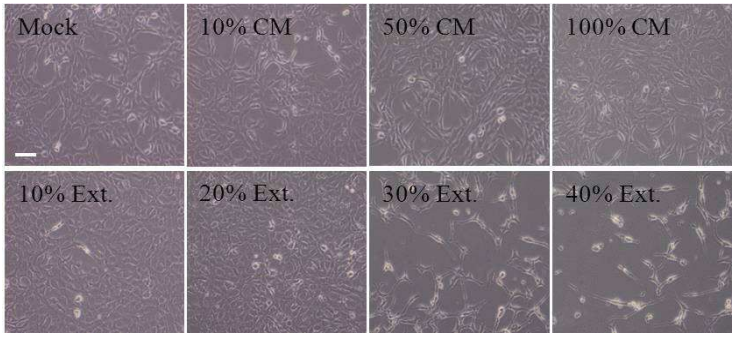
도면1



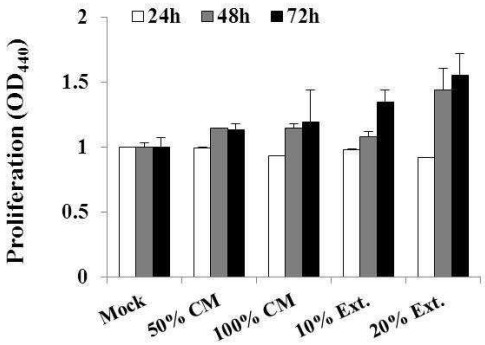
도면2a



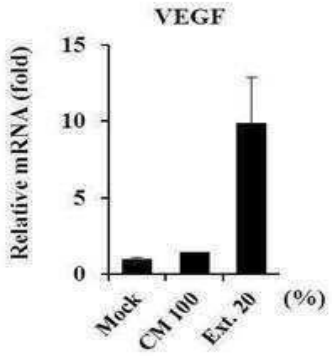
도면2b



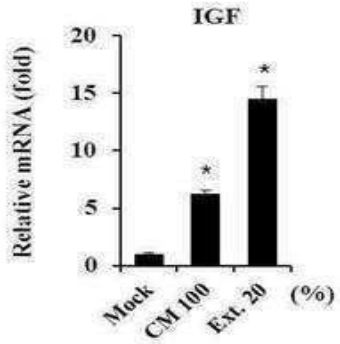
도면3



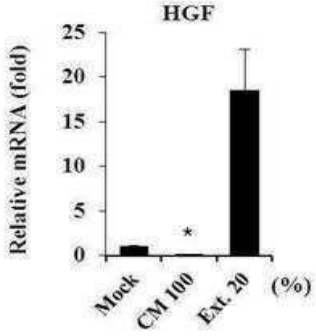
도면4a



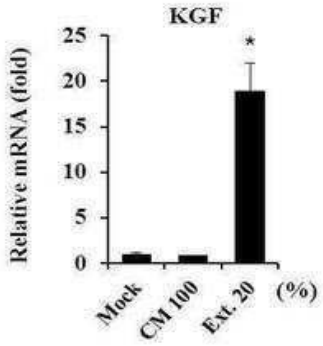
도면4b



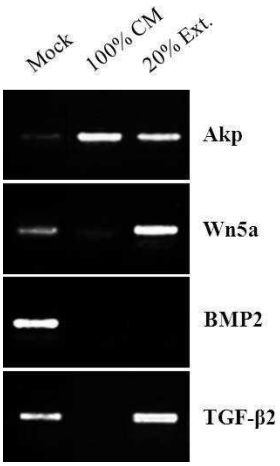
도면4c



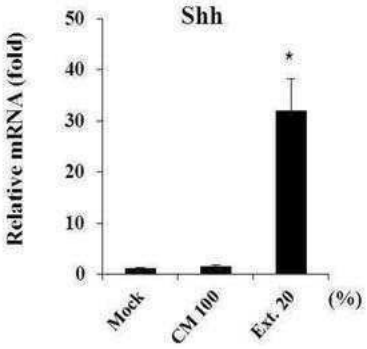
도면4d



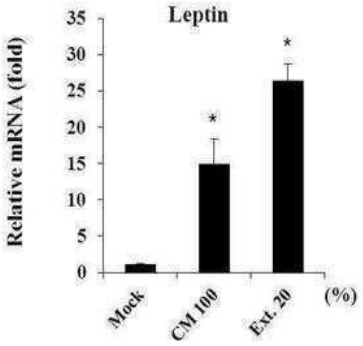
도면4e



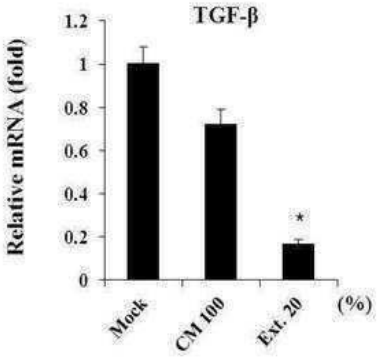
도면5a



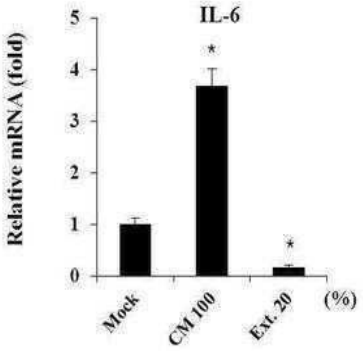
도면5b



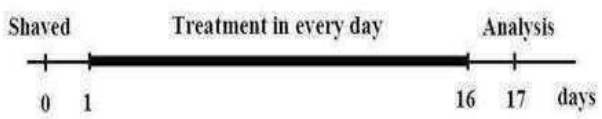
도면6a



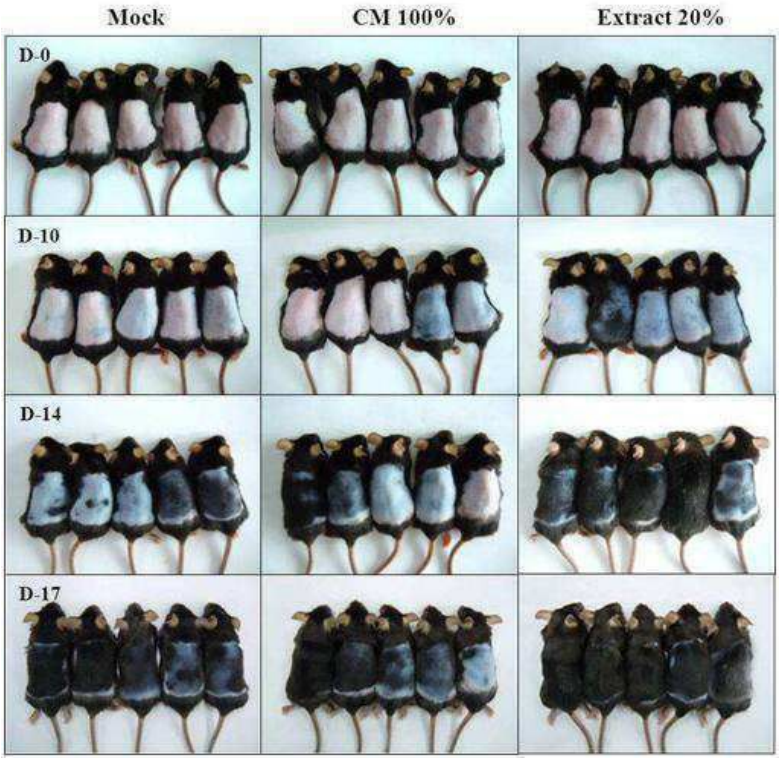
도면6b



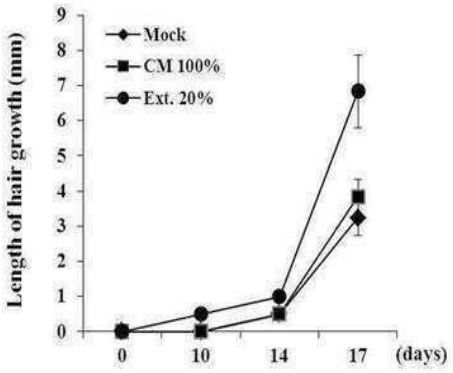
도면7a



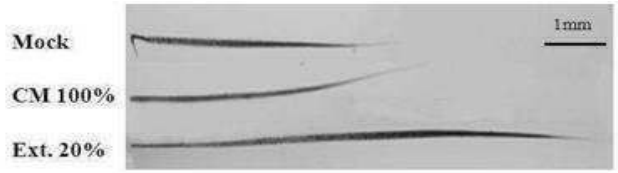
도면7b



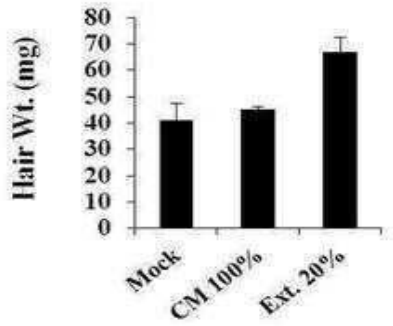
도면8a



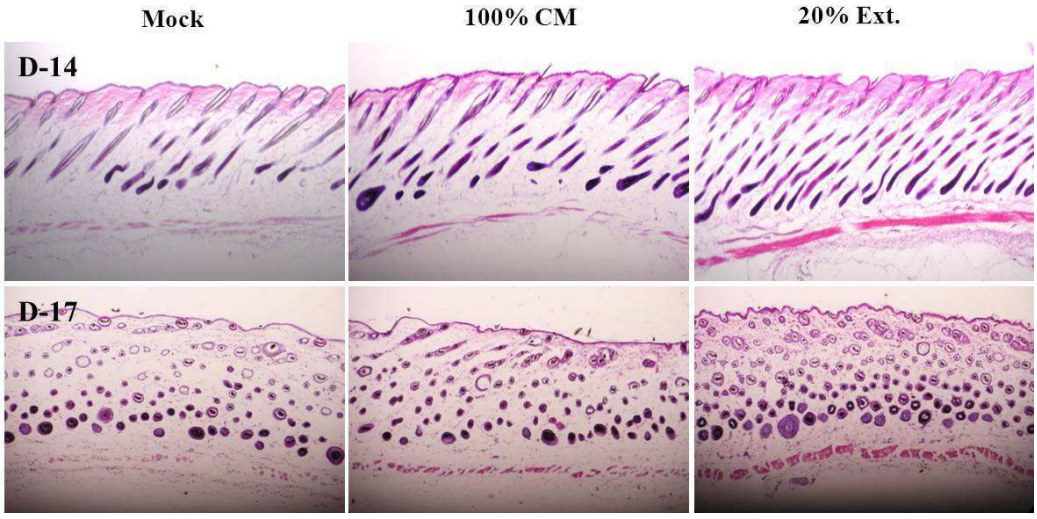
도면8b



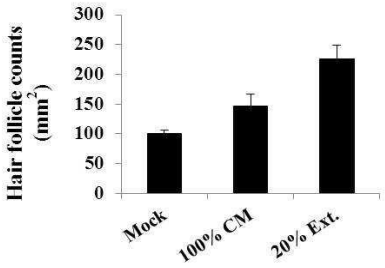
도면8c



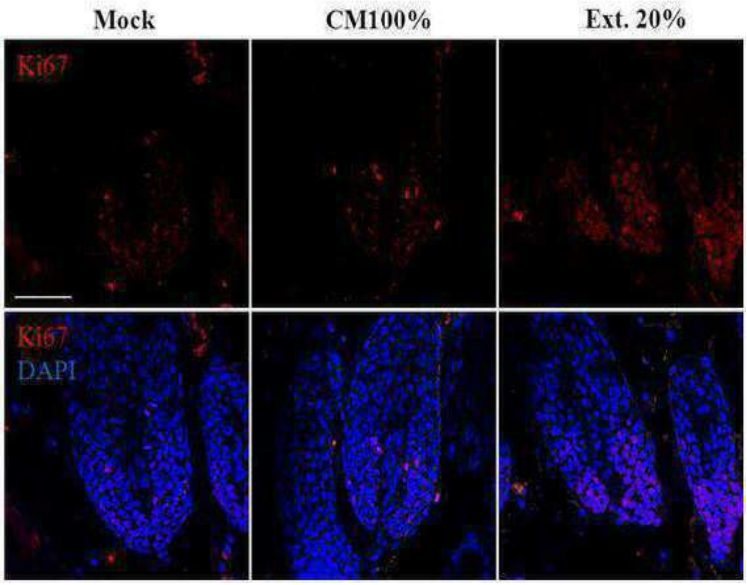
도면9a



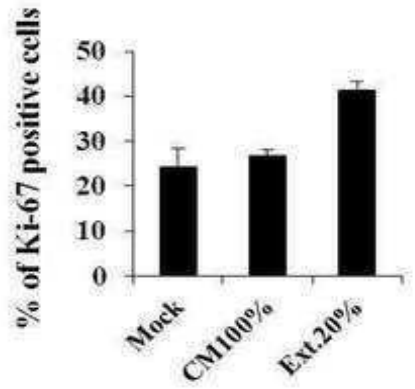
도면9b



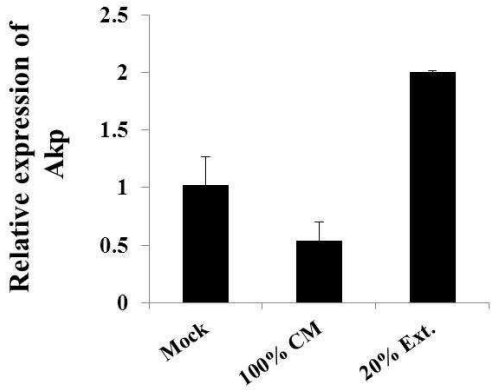
도면10a



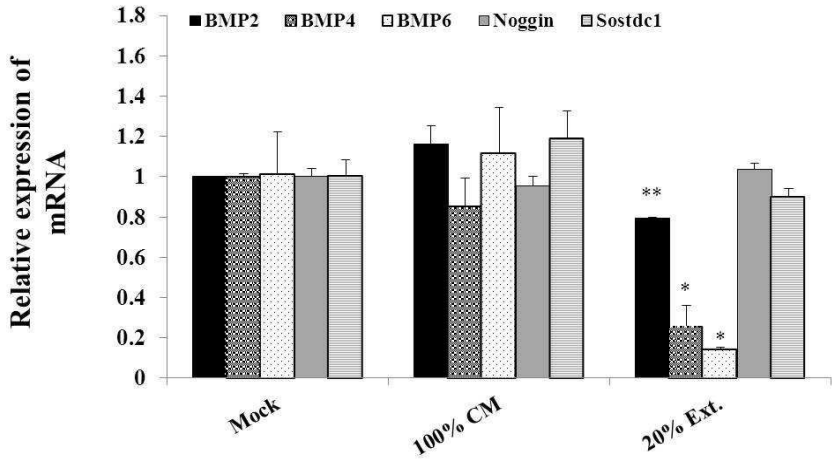
도면10b



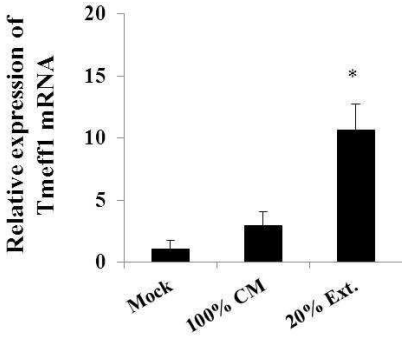
도면11



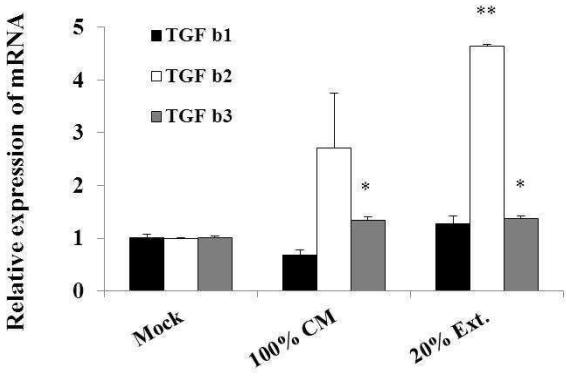
도면12



도면13a



도면13b



도면14

