(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0004837
(43) 공개일자 2022년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/64 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01) *A61Q 5/00* (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/64 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0081326
(22) 출원일자 2020년07월02일
심사청구일자 2020년07월02일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
최광성
서울특별시 양천구 목동서로 70, 207동 402호(목동, 목동신시가지아파트2단지)
류지간
인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 77, 902동 701호(송도동, 더샵 엑스포)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 8 항

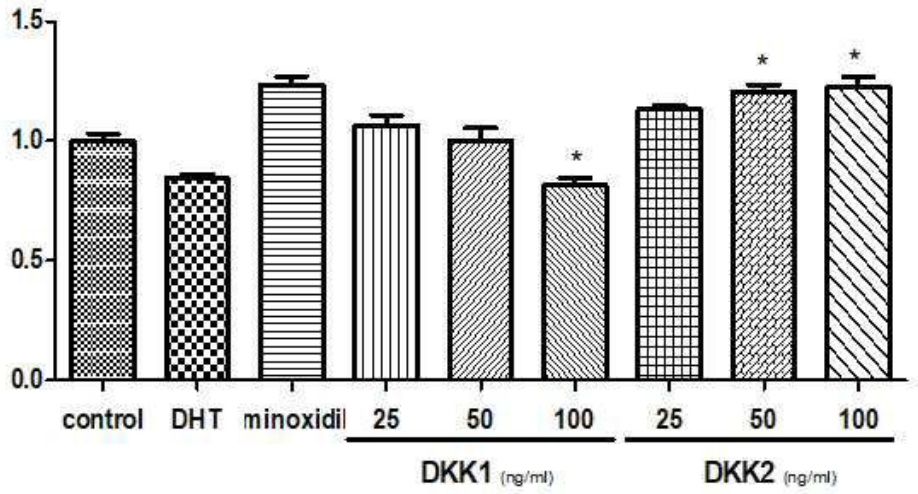
(54) 발명의 명칭 **DKK2를 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 DKK2(Dickkopf-related protein 2)를 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 DKK2 단백질, 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.

상기 DKK2 단백질은 모유두 세포의 증식 향상에 우수한 효과를 가지며, 모유두 세포 증식 향상과 관련된 ERK, Cyclin-D1, β-catenin, Wnt, Bcl-2, BAX 등의 유전자 또는 단백질의 발현 증가에 관여하는 바, 이를 이용하여 효과적으로 탈모를 예방하고 발모를 촉진시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2020.05)
A61K 8/606 (2013.01)
A61P 17/14 (2018.01)
A61Q 5/00 (2013.01)
A61Q 7/00 (2019.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자
신정현
서울특별시 강남구 남부순환로397길 5, 302호(대치동, 미도맨션)
변지원
인천광역시 중구 인항로 30, 106동 1903호(신흥동3가, 신흥아이파크)
신현태
경기도 안양시 만안구 와룡로4번길 26, 202호(석수동, 우양빌라)
이혜민
인천광역시 미추홀구 인하로 303-2(주안동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는,

모유두 세포의 증식을 향상시키는 것을 특징으로 하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는,

모유두 세포의 증식 향상에 관여하는 ERK(extracellular signal-regulated kinases), 사이클린-D1(Cyclin-D1), β-카테닌(β-catenin), Wnt, Bcl-2(B-cell lymphoma 2) 및 BAX로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는,

전체 화장료 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 10 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은,

헤어토닉, 헤어크림, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어스프레이, 헤어에어졸, 헤어팩, 헤어왁스, 헤어염색제 또는 헤어젤의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 6

DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 약학 조성물.

청구항 7

DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 건강식품 조성물.

청구항 8

개체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;

상기 시험물질을 처리한 시료에서 DKK2 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준을 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준이 증가된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 발모제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DKK2(Dickkopf-related protein 2)를 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 DKK2 단백질, 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 사람의 모발은 인간의 외모의 가장 중요한 측면 중 하나로 간주된다. 사람의 모발은 피부 및 두피를 보호하는 일차적인 역할뿐만 아니라, 사회적 및 성적 의사소통에 있어서 고유의 역할을 하므로 매우 중요하다. 탈모(alopecia)는 정상적으로 모발이 존재해야 하는 부위에 모발이 없는 상태를 말하거나 성장을 멈춘 모발이 자연스럽게 빠지는 현상을 의미하며, 일반적으로는 두피의 성모(굵고 검은 머리털)가 빠지는 것을 의미한다. 모발은 보통 하루에 50~100개 이상 정도가 빠지며, 머리가 빠지는 숫자가 많을수록 탈모증이라고 정의한다.

[0003] 최근 급속한 경제 성장과 생활수준의 향상으로 사람들의 삶의 질은 향상되었으나, 이에 따른 공해와 환경오염의 발생으로 인해 현대인들은 외부의 자극과 각종 질병에 노출되어 있다. 특히 모발과 관련하여 국소 감염, 유전적 소인, 내분비 장애 등에 의해 탈모증이 발병된다고 밝혀졌으나, 최근의 연구에서는 스트레스, 환경오염에 의한 부작용, 화학적 제품에 의한 부작용 등 탈모에 관련한 다양한 요인들이 작용하는 것으로 나타났다.

[0004] 국내에서도 탈모 관련 많은 연구들이 진행되고 있고, 최근에는 육모 및 탈모 기전에 관여하는 많은 조절 인자들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 시중에 유통되고 있는 발모 관련 제품들은 다양하고 많으나, 대부분 탈모 방지 및 발모 효과가 미비하거나 일시적이어서 사용자의 요구를 충족하지 못하고 있다. 또한, 상기 제품의 효능이나 안전성에 관한 근거 자료 또한 미흡하고, 상기 제품의 사용을 중단할 시에는 다시 탈모증이 재발되거나 성기능 장애가 발생하는 등 심각한 부작용 등이 보고되면서 사용에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

[0005] 따라서 독성이나 부작용이 적으며 탈모 방지 또는 발모 촉진 효과가 우수한 탈모 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2013-0021315호 (2013.03.05. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 모발 성장에 우수한 효과를 가진 단백질을 포함하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 이용한 발모제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방

또는 발모 촉진용 화장료 조성물, 약학 조성물 및 건강식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 개체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질을 처리한 시료에서 DKK2 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준을 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준이 증가된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 발모제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 DKK2 단백질은 모유두 세포의 증식 향상에 우수한 효과를 가지며, 모유두 세포 증식 향상과 관련된 ERK, Cyclin-D1, β-catenin, Wnt, Bcl-2, BAX 등의 유전자 또는 단백질의 발현 증가에 관여하는 바, 본 발명에 따른 화장료 조성물, 약학 조성물 및 건강식품 조성물은 상기 DKK2 단백질, 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유함으로써, 효과적으로 탈모를 예방하고 발모를 촉진시킬 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 이용하여, 우수한 효과를 가진 발모제를 선별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따른 모유두 세포의 증식 여부를 확인한 결과 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실험예 2에 따른 모발 성장과 관련된 인자들의 단백질 발현 변화를 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 실험예 3에 따른 모발 성장 관련 유전자 Wnt의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실험예 4에 따른 모발 성장 관련 유전자 β-카테닌(β-catenin)의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실험예 5에 따른 모발 성장 억제 관련 유전자 BMP의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0016] 본 발명자들은 모발 성장에 영향을 미치는 물질을 모유두 세포를 이용하여 검증하였다. 발모 약물로 사용되고 있는 미녹시딜(minoxidil)을 양성대조군으로 하고, 모발의 성장을 억제하는 것으로 알려진 수 종의 물질도 함께 비교하여, DKK2에서 모유두 세포 성장에 우수한 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0018] 본 발명은 DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 화장료 조성물을 제공한다.

[0019] 본 명세서에서, "DKK2 단백질"이란, 디코프-관련 단백질 2(Dickkopf-related protein 2)로, 인간의 경우, DKK2 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다. 분비된 단백질은 두 개의 시스테인(cysteine) 풍부 영역을 함유하고, Wnt 신호 전달 경로와의 상호 작용을 통해 배아 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0020] 상기 DKK2 단백질은 DKK2 단백질 전체뿐만 아니라 이와 실질적으로 동일한 활성을 가진 이의 생리학적 활성 단편 또는 이와의 융합 단백질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 상기 DKK2 단백질 활성화제 또는 이의 발현 촉진제는 공지된 DKK2 단백질 활성화제 또는 이의 발현 촉진제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 DKK2 단백질 활성화제 또는 이의 발현 촉진제는 직접적 또는 간접적으로 DKK2 단백질의 발현 또는 활성을 증진시킬 수 있는 물질을 모두 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는 모유두 세포의 증식을 향상시키는 효과를 가져, 탈모를 예방하고 발모를 촉진시킬 수 있다.

[0024] 본 명세서에서, "모유두(Humam dermal papilla, HDP) 세포"는 모낭 하부의 모유두(dermal papilla)에 위치한 세포로써, 모낭의 발달 및 성장을 조절한다. 모유두 세포에는 모세혈관이 분포하고 있어, 이를 통해 모낭에 영양을 공급하고 성장인자와 저해인자를 분비하여 모낭 상피세포의 성장을 조절할 수 있다. 또한, 모유두 세포는 여러 성장인자와 사이토카인(cytokine)을 생성하여 모발의 생성, 증식, 분화에 관여한다.

[0025] 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는 모유두 세포의 증식 향상에 관여하는 ERK(extracellular signal-regulated kinases), 사이클린-D1(Cyclin-D1), β-카테닌(β-catenin), Wnt, Bcl-2(B-cell lymphoma 2) 및 BAX로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 유전자 또는 이의 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0026] 특히, Wnt/β-catenin은 모발 성장에서 중요한 신호전달계로, 모낭의 형성을 촉진하고, 모발 성장 시에 발현하는 유전자를 활성화하는 데 중요한 역할을 한다. Wnt 단백질은 Wnt 경로(Wnt pathway)의 리간드로 사용되는 단백질로, β-카테닌(β-catenin)의 안정성을 조절하며, Wnt 신호 전달 활성을 통해 β-카테닌을 증가시켜 모유두 세포의 성장을 촉진시킬 수 있다.

[0027] 발모에 효과적인 물질은 상기 Wnt 및 β-catenin 유전자 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있는데, 본 발명의 일 실험예에 따르면, DKK2를 처리한 경우, 양성대조군인 미녹시딜 보다 더 강하게 Wnt 및 β-catenin 유전자와 이의 단백질의 발현 또는 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 즉, DKK2는 발모에 효과적인 물질임을 확인할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는, 전체 화장료 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 10 중량부로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 당업계의 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있고, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말, 샴푸 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 바람직하게는 상기 화장료 조성물은 모발, 두피에 사용하는 모든 형태의 화장료로 제조될 수 있고, 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 DKK2 단백질, 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 헤어토닉, 헤어크림, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어스프레이, 헤어에어졸, 헤어팩, 헤어왁스, 헤어염색제 또는 헤어젤의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 상기 화장료 조성물은 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자 외에 모발 화장료 제제에 있어서 수용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체로서는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 방부제, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 차단제, 발색제, 향료, 희석제 등이 포함될 수 있다.

[0034] 상기 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 방부제, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 차단제, 발색제, 향료, 희석제 등으로 사용될 수 있는 구체적인 화합물 또는 조성물은 이미 당업계에 공지되어 있기 때문에 당업자라면 적절한 해당 화합물 또는 조성물을 선택하여 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키고 부작용을 최소화하기 위해 피부 흡수 촉진제, 두피 보호제 또는 두피 활성제 등을 더 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명은 DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 약학 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는 모유두 세포의 증식을 향상시키는 효과를 가져, 탈모를 예방하고 발모를 촉진시킬 수 있다.

[0039] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자의 활성 또는 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

[0042] 본 명세서에서, "약학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 의미한다.

[0044] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0045] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.

[0046] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0047] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있으며, 바람직하게는 국소형 제형, 예를 들어, 크림, 로션, 연고(반고형의 외용약), 마이크로에멀젼, 젤, 페이스트, 경피제제(TTS)(패치제, 붕대 등) 등으로 제조될 수 있다.

[0048] 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있고, 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 등을 더 첨가할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.

[0053] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있으며, 이는 두피의 상태, 탈모의 진행 정도 등 상황에 따라 적절히 증감할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에 따른 약학 조성물은 탈모증이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracere-

broventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있으며, 바람직하게는 두피, 특히 두피의 탈모 부위나 모발에 직접 도포하거나 살포하는 등의 경피 투여 방법으로 투여될 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 약학 조성물은 탈모 예방 또는 발모 촉진을 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 미녹시딜(minoxidil), 피나스테라이드(finasteride) 등의 탈모 치료제를 더 포함할 수 있고, 병풍 추출물, 로즈마리 추출물, 해초 추출물 등의 천연 추출물을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명은 DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 탈모 예방 또는 발모 촉진용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자는 모유두 세포의 증식을 향상시키는 효과를 가져, 탈모를 예방하고 발모를 촉진시킬 수 있다.

[0061] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 건강식품 조성물에 있어서, 상기 건강식품은 탈모 예방 또는 발모 촉진의 목적으로, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 건강식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다. 상기 건강식품은 건강보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등을 포함할 수 있고, 또는 천연식품, 가공식품 등에 본 발명에 따른 조성물이 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 상기 건강식품은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과실 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[0066] 상기 건강식품 조성물은 유효성분인 상기 DKK2 단백질, 이의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 이의 유전자 외에 감미제, 풍미제, 생리활성 성분, 미네랄 등이 더 포함될 수 있다.

[0067] 상기 건강식품 조성물은 상기 감미제 등 이외에도 필요에 따라 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등을 포함할 수 있다. 이러한 보존제, 유화제 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 건강식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005 중량% 내지 약 0.5중량% 범위일 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명에 따른 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0070] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존 료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0072] 본 발명은 개체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질을 처리한 시료에서 DKK2 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준을 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준이 증가된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 발모제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0073] 본 명세서에서, "개체"란, 탈모증이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다.

[0074] 상기 "개체에서 분리된 생물학적 시료"는 DKK2 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준이 차이나는 조직 또는 세포 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 상기 스크리닝 방법은 발모제 후보 물질의 존재 및 부재 하에서 상기 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로, 발모제, 발모 촉진제, 탈모 억제제 등을 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다. 상기 DKK2 단백질 또는 이의 유전자의 발현 또는 활성 수준을 증가시키는 물질은 이러한 탈모 치료제로 선택될 수 있다.

[0076] 상기 단백질 발현 또는 활성 수준은 웨스턴 블롯, 효소면역분석법(Enzymelinked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역 전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석법(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 상기 유전자의 발현 수준은 중합효소반응(PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA: RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 마이크로 어레이 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0079] 또한, 본 발명은 DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 모유두 세포 증식 촉진용 시약 조성물을 제공한다.

[0081] 또한, 본 발명은 사람을 제외한 동물에 DKK2 단백질(Dickkopf-related protein 2), 상기 단백질의 활성화제 또는 이의 발현 촉진제, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 중 하나 이상을 처리하는 단계;를 포함하는 모유두 세포 증식 촉진 방법을 제공한다.

[0082] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[0084] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0086] **<준비예 1>**

[0087] * DKK1 : Recombinant Human Dkk-1 Protein (R&D system, cat.no: 5439-DK-010)

[0088] * DKK2 : Recombinant Human Dkk-2 Protein (R&D system, cat.no: 6628-DK-010)

[0089] * Media : Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium (promocell cat.no: C-26501) - Supplement Mix (Fetal Calf Serum, Bovine Pituitary Extract, Basic Fibroblast Growth Factor, Insulin)

[0091] **<실험예 1> DKK2 처리에 따른 모유두 세포 증식 확인**

[0092] 1. 실험방법

[0093] 모유두 세포(human dermal papilla cell)를 96웰 세포배양 접시에 37℃, CO_2 5% 조건으로 배양기에서 배양하였으며, 각 웰당 세포 수는 1×10^5이다. 24시간 후 각 웰에 해당 시료를 처리하였고 72시간 후에 세포 증식 분석

법을 진행하였다.

[0094] 시료는 기본배지 배양군(control), 20μM 디하이드로테스토스테론(Dihydrotestosterone, DHT), 1μM 미녹시딜(minoxidil), DKK1 (25, 50, 100ng/ml), DKK2 (25, 50, 100ng/ml)를 사용하였다. [^{3}H]-티미딘(thymidine)이 포함된 시약을 각 웰에 15μl씩 처리하고 4시간 동안 37℃, CO_2 5% 배양기에서 배양하였다. 정지 시약을 100μl 처리하고, 잘 섞어 1시간 후에 마이크로플레이트 리더기(microplate reader)로 570mm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0096] 2. 실험결과

[0097] 도 1은 본 발명의 실험예 1에 따른 모유두 세포의 증식 여부를 확인한 결과 그래프이다.

[0098] 도 1을 참조하면, 모유두 세포 증식의 억제 물질로 알려진 DHT 및 DKK1을 각각 처리한 경우에는 모유두 세포의 증식이 억제되는 것으로 나타났고, 양성대조군인 미녹시딜을 처리한 경우에는 모유두 세포의 증식이 향상되었으며, DKK2를 처리한 경우 역시, 양성대조군인 미녹시딜과 유사한 정도로 모유두 세포의 증식이 향상되는 것으로 나타났다.

[0100] **<실험예 2> DKK2 처리에 따른 모발 성장 인자 단백질 발현 변화 확인**

[0101] 1. 실험방법

[0102] 모유두 세포를 3×10^{5} 세포/웰로 6웰 세포배양 접시에 24시간 동안 배양하였다. 이 후 각 웰에 해당 시료를 처리하였고 72시간 후에 RIPA 시약으로 세포를 용해하여 단백질 샘플을 얻었다. 단백질 샘플은 웨스턴 블롯(western blot)을 진행하기 위해 4-12% SDS 겔에 로딩되었다. 100V로 2시간 동안 로딩되었고, PVDF 멤브레인에 트랜스퍼하였다. BSA로 45분간 블락킹하여 비특이적 결합을 막았다. 1차 항체는 1:1000의 농도로 PBS에 희석하여 사용하였고 4℃에서 16시간 동안 반응시켰으며, 10분씩 2번 PBS-T로 세척하였다. 2차 항체는 HRP(Horseradish peroxidase)를 가지고 있는 항체를 사용하였고 1:2000의 농도로 1시간 동안 반응하였다. 10분씩 2번 세척을 하고 ECL 시약에 HRP를 반응시켜 이를 케미닥을 통해 이미지화하여 분석하였다.

[0104] 2. 실험결과

[0105] 도 2는 본 발명의 실험예 2에 따른 모발 성장과 관련된 인자들의 단백질 발현 변화를 확인한 것이다.

[0106] 도 2를 참조하면, 모유두에서 모발의 성장에 관여하는 ERK(extracellular signal-regulated kinases), 사이클린-D1(Cyclin-D1), β-카테닌(β-catenin), Bcl-2(B-cell lymphoma 2), BAX, 및 β-actin 단백질의 발현을 확인한 결과, DKK2는 양성대조군인 미녹시딜과 유사하거나 더 강하게 모유두의 증식을 촉진하는 단백질의 발현을 증가시킴을 확인하였다.

[0108] **<실험예 3> DKK2 처리에 따른 모발 성장 관련 유전자 Wnt 발현 변화 확인**

[0109] 1. 실험방법

[0110] 모유두 세포를 6웰 세포배양 접시에 3×10^{5} 세포/웰로 24시간 동안 배양 후 각 시약을 처리하였다. 시약 처리 후 72시간 뒤에 트리졸을 이용해 세포를 용해하였다. 이 후 클로로포름으로 RNA 층을 분리하고 이소프로판올로 RNA를 침전시켜 분리하였다. 이를 에탄올로 세척해주고 건조하여 사용하였다. 분리한 RNA를 역전사효소를 이용해 cDNA로 합성하였다. cDNA를 DNA 합성효소, 프라이머 함께 특정 DNA를 증폭하고 이를 SYBR green의 형광을 실시간으로 측정하여 mRNA의 발현정도를 측정하였다.

[0111] 하기 표 1은 실험예 3에 사용된 프라이머이다.

표 1

[0112]

타겟	방향	5' → 3'	서열번호
Wnt 3	정방향	cctcaaggacaagtacgaca	1
Wnt 3	역방향	ggcaccttgaagtaggtgta	2
Wnt 5a	정방향	aattctggctccacttgttg	3
Wnt 5a	역방향	caattacaacctgggcgaag	4
Wnt 7a	정방향	tctgtaacaagatcccaggc	5
Wnt 7a	역방향	cattgcggaactgaaactga	6
Wnt 10b	정방향	aatgcgaatccacaacaaca	7
Wnt 10b	역방향	acagcacatagcagcaccag	8

[0114] 2. 실험결과

[0115] 도 3은 본 발명의 실험예 3에 따른 모발 성장 관련 유전자 Wnt의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

[0116] 모발 성장에서 가장 중요한 유전자는 Wnt로 알려져 있고, 현재까지 발모에 효과적인 물질은 Wnt 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있어 이를 확인한 결과, 도 3과 같이, DKK2를 처리한 경우, 양성대조군인 미녹시딜 보다 더 강하게 Wnt 유전자의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있다.

[0118] **<실험예 4> DKK2 처리에 따른 모발 성장 관련 유전자 β-catenin 발현 변화 확인**

[0119] 1. 실험방법

[0120] 모유두 세포를 6웰 세포배양 접시에 3×10^5 세포/웰로 24시간 동안 배양 후 각 시약을 처리하였다. 시약 처리 후 72시간 뒤에 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 역전사효소를 이용해 cDNA로 합성하였다. cDNA를 특정 프라이머를 이용하여 증폭하고 이를 SYBR green의 형광을 실시간으로 측정하여 mRNA의 발현정도를 측정하였다.

[0121] 하기 표 2는 실험예 4에 사용된 프라이머이다.

표 2

[0122]

타겟	방향	5' → 3'	서열번호
β-catenin	정방향	tttaagcctctcgggtctgtg	9
β-catenin	역방향	caaataccctcaggggaca	10
AP1	정방향	tgtccgagaactaaagccaa	11
AP1	역방향	aaaagtccaacgttccgttc	12
Lef1	정방향	cagtgacgagcacttttctc	13
Lef1	역방향	cgtgatgggatatacaggct	14
Axin2	정방향	cagtggatgctggagagtga	15
Axin2	역방향	tgccagtttctttggctctt	16

[0124] 2. 실험결과

[0125] 도 4는 본 발명의 실험예 4에 따른 모발 성장 관련 유전자 β-catenin의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

[0126] 도 4를 참조하면, 모발의 성장에 관여하는 Wnt-β-catenin pathway에서. DKK2는 양성대조군인 미녹시딜 보다 더 강하게 β-catenin 유전자의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있다.

[0128] **<실험예 5> DKK2 처리에 따른 모발 성장 억제 관련 유전자 BMP 발현 변화 확인**

[0129] 1. 실험방법

[0130] 모유두 세포를 6웰 세포배양 접시에 3×10^5 세포/웰로 24시간 동안 배양 후 각 시약을 처리하였다. 시약 처리 후 72시간 뒤에 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 역전사효소를 이용해 cDNA로 합성하였다. cDNA를 특정 프라이머를 이용하여 증폭하고 이를 SYBR green의 형광을 실시간으로 측정하여 mRNA의 발현정도를 측정하였다.

[0131] 하기 표 3는 실험예 5에 사용된 프라이머이다.

표 3

[0132]

타겟	방향	5' → 3'	서열번호
BMP2	정방향	caggtcctttgaccagagtt	17
BMP2	역방향	ccatggtcgacctttaggag	18
BMP4	정방향	attcccgtccaagctatctc	19
BMP4	역방향	ctacggaatggctccatagg	20

[0134] 2. 실험결과

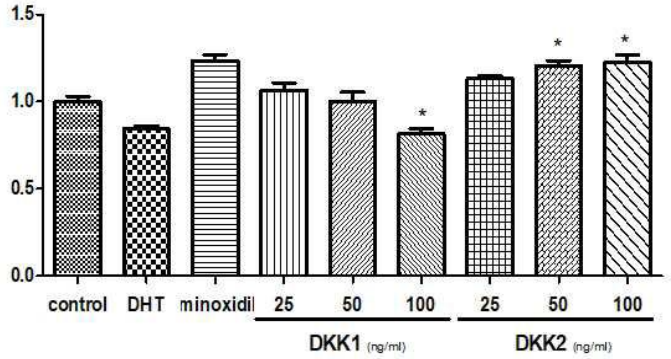
[0135] 도 5는 본 발명의 실험예 5에 따른 모발 성장 억제 관련 유전자 BMP의 발현 변화를 나타낸 그래프이다.

[0136] BMP는 모발의 성장을 억제하는 기능이 있음이 알려져 있는 바, 도 5를 참조하면, 모발의 성장을 억제하는 DHT나 DKK1은 BMP 유전자의 발현을 증가시키나, DKK2나 미녹시딜은 BMP의 발현이 증가하지 않는 경향을 보였다.

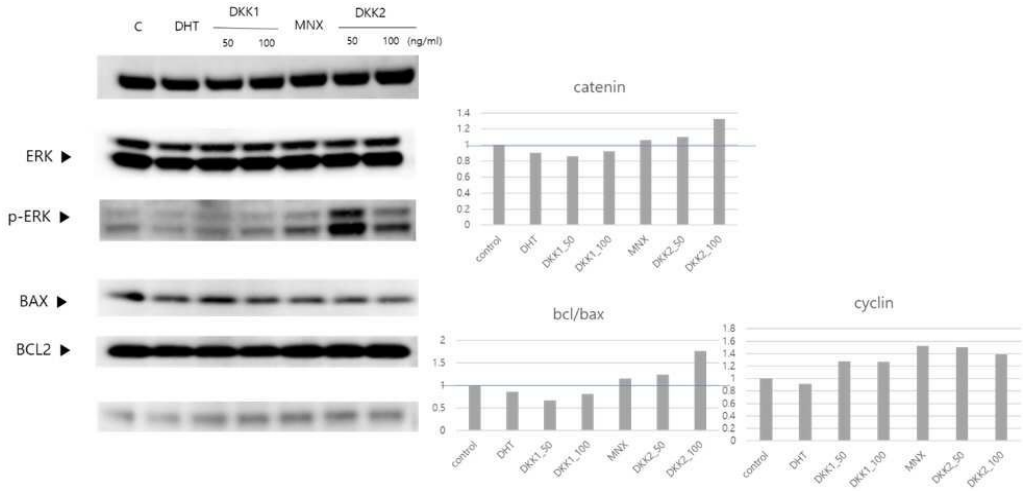
[0138] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

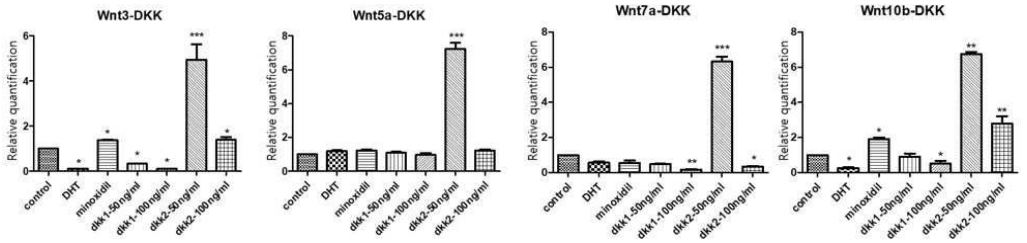
도면1



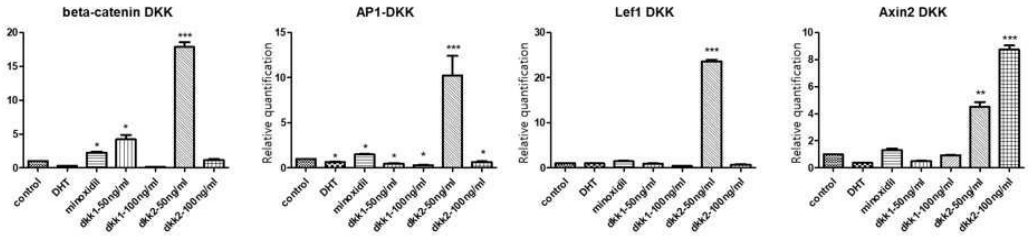
도면2



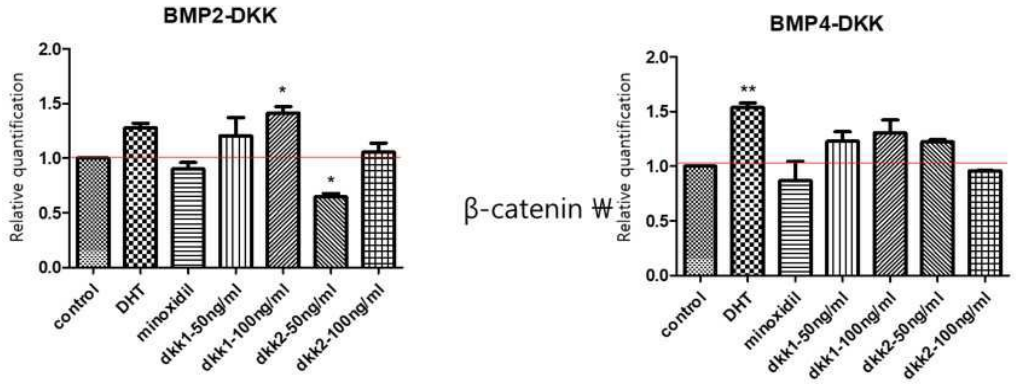
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE

<120> COMPOSITION FOR PREVENTING ALOPECIA OR PROMOTING HAIR GROWTH COMPRISING DKK2

<130> ADP-2020-0238

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 3/f

<400> 1

cctcaaggac aagtacgaca 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 3/r

<400> 2

ggcaccttga agtaggtgta 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 5a/f

<400> 3

aattctggct ccacttgttg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 5a/r

<400> 4

caattacaac ctgggcgaag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 7a/f

<400> 5

tctgtaacaa gatcccaggc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 7a/r

<400> 6

cattgcggaa ctgaaactga 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 10b/f

<400> 7

aatgcgaatc cacaacaaca 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Wnt 10b/r

<400> 8

acagcacata gcagcaccag 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-catenin/f

<400> 9

tttaagcctc tcgggtctgt g 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-catenin/r

<400> 10

caaataccct caggggaca 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AP1/f

<400> 11

tgtccgagaa ctaaagccaa 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AP1/r

<400> 12

aaaagtccaa cgttccgttc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lef1/f

<400> 13

cagtgacgag cacttttctc 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lef1/r

<400> 14

cgtgatggga tatacaggct 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Axin2/f

<400> 15

cagtggatgc tggagagtga 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Axin2/r

<400> 16

tgccagtttc tttggctctt 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BMP2/f

<400> 17

caggtccttt gaccagagtt 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BMP2/r

<400> 18

ccatggtcga cctttaggag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BMP4/f

<400> 19

attcccgtcc aagctatctc 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BMP4/r

<400> 20

ctacggaatg gctccatagg 20