

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(43) 국제공개일  
2010년 9월 23일 (23.09.2010)

PCT

(10) 국제공개번호  
WO 2010/107287 A2

- (51) 국제특허분류:  
A61K 8/98 (2006.01) A61K 35/12 (2006.01)  
A61Q 7/00 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/001730
- (22) 국제출원일: 2010년 3월 19일 (19.03.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2009-0024056 2009년 3월 20일 (20.03.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 스템메디언스 (STEMMEDIENCE CO., LTD) [KR/KR]; 서울 강남구 삼성동 51번지 청송빌딩 301, 135-090 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 유승권 (YOU, Seungwon) [KR/KR]; 경기 용인시 처인구 양지면 평창리 13-4, 449-821 Gyeonggi-do (KR). 윤병선 (YOON, Byung Sun) [KR/KR]; 서울 광진구 구의 1동 248-85, 143-826 Seoul (KR). 정혜연 (JUNG, Hye-Youn) [KR/KR]; 대전 서구 둔산 3동 가람아파트 2동 1303호, 302-744 Daejeon (KR). 전은경 (JUN, Eun Kyoung) [KR/KR]; 경기 성남시 중원구 중동 3587번지 2층, 462-837 Gyeonggi-do (KR). 문재희 (MOON, Jai-Hee)

[KR/KR]; 서울 노원구 하계동 한신아파트 1동 206호, 139-230 Seoul (KR). 김종건 (KIM, Jonggun) [KR/KR]; 서울 노원구 공릉 2동 441-60, 139-804 Seoul (KR). 이중한 (LEE, Jung Han) [KR/KR]; 서울 종로구 무악동 인왕산 I-PARK 아파트 105동 1203호, 110-877 Seoul (KR). 박을순 (PARK, Eulsoon) [KR/KR]; 서울 성북구 보문동 2가 82번지 스카이빌 401호, 136-082 Seoul (KR). 맹이삭 (MAENG, Isaac) [KR/KR]; 경기 남양주시 퇴계원면 224-24 쌍용에가아파트 1402호, 472-816 Gyeonggi-do (KR). 김준성 (KIM, Jun Sung) [KR/KR]; 경기 구리시 교문동 우성한양아파트 105동 701호, 471-020 Gyeonggi-do (KR). 이장호 (LEE, Jang Ho) [KR/KR]; 서울 송파구 방이동 89 올림픽선수촌아파트 301동 404호, 138-050 Seoul (KR). 이광희 (LEE, Hwang Heui) [KR/KR]; 서울 광진구 광장동 218-1 광장극동아파트 2동 1401호, 143-751 Seoul (KR). 이종원 (LEE, Jong Won) [KR/KR]; 경기 용인시 수지구 고기동 136, 448-110 Gyeonggi-do (KR). 조정식 (CHO, Kyoung Shik) [KR/KR]; 서울 구로구 구로 5동 110-5 구로하우비 310호, 152-844 Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9도심공향타워 6층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

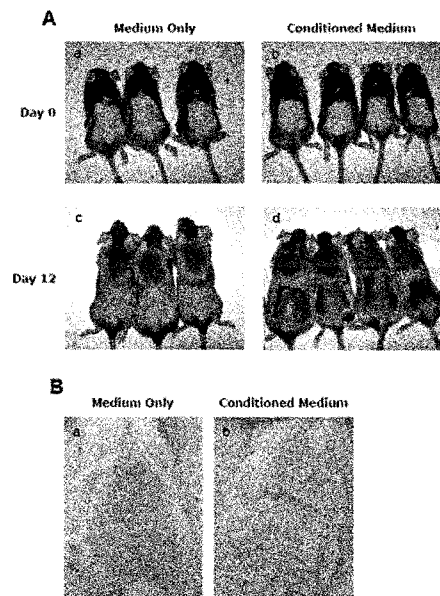
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR TRICHOGENOUSNESS USING FETAL MESENCHYMAL STEM CELLS FROM AMNIOTIC FLUID

(54) 발명의 명칭 : 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 이용한 발모촉진용 조성물

[Fig. 8]



(57) Abstract: The present invention relates to a medium for fetal mesenchymal stem cells from amniotic fluid. More specifically, the present invention relates to a composition for trichogenesis or preventing depilation, which comprises the medium for fetal mesenchymal stem cells from amniotic fluid as an active ingredient. In addition, the present invention relates to a preparation method of the composition, which comprises: incubating fetal mesenchymal stem cells from amniotic fluid; and collecting the medium.

(57) 요약서: 본 발명은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진 또는 탈모 방지용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 배양하는 단계 및 상기 배양액을 수거하는 단계를 포함하는 상기 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

WO 2010/107287 A2



AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

## 명세서

### 발명의 명칭: 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 이용한 발모촉진용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진 또는 탈모 방지용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 배양하는 단계 및 상기 배양액을 수거하는 단계를 포함하는 상기 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 줄기세포(stem cell)는 적합한 환경 및 자극을 통해 각종 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖추고 있으며, 자가증식 능력을 갖추고 있는 세포로서, 초기 배아에서 분리한 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ES 세포), 배아의 원시 생식세포에서 분리한 배아 생식세포(embryonic germ cell, EG 세포), 및 성체의 골수에서 분리한 다능성 성체줄기세포(multipotent adult progenitor cell, MAPC 세포)의 3종이 가장 잘 알려져 있다. 줄기세포는 특징적인 현상과 특화된 기능을 가지는 세포로 발달하는 잠재력을 가지고 있으므로, 각종 장기에 대한 기능회복을 위한 세포자원으로서 연구의 대상이 되고 있다.
- [4] 지금까지 알려진 바에 의하면 성체줄기세포는 여러 가지 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다고 알려져 있다. 성체줄기세포는 골수(bone marrow) (*Science* 276, 71-74, 1997; *Science* 284, 143-147, 1999; *Science* 287, 1442-1446, 2000), 골격근(skeletal muscle) (*Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 14482-14486, 1999; *Nature* 401, 390-394, 1999)과 지방조직(Fat tissue) (*Tissue Eng* 7, 211-228, 2001; *J. Cell. Physiol.* 206, 229-237, 2006)에서 분리하였으며, 이들은 각각 유사한 계통으로 분화가 가능하다.
- [5] 성체 줄기세포의 종류인 골수에서 유래한 중간엽줄기세포는 오래전부터 사용되어 오고 있고 효과도 입증된 세포이다. 또한, 최근에는 지방조직이나 다른 조직에서 분리한 세포들도 골수유래 중간엽줄기세포와 비슷한 특성을 가지고 있다는 연구 결과가 나오고 있다. 그러나 분리 및 다량의 세포 획득이 어려워 다른 대체할 수 있는 소스가 시급히 필요하다.
- [6]
- [7] 이에, 본 발명자들은 산모나 태아에게 해롭지 않게 쉽게 분리 가능한 양수에 초점을 맞추어 연구하였다.
- [8] 수정란이 수정 후 자궁벽에 착상한 다음 수일이 지나게 되면 배아는 양수로 채워진 양막낭에 둘러싸이게 된다. 양수에는 태아의 몸으로부터 나온 여러

물질들이 섞여 있으므로, 양수를 분석함으로써 태아의 염색체에 이상이 있는지, 세균에 감염되지 않았는지 등을 알 수 있다. 또한 양수는 태아가 자유롭게 움직이게 할 뿐만 아니라, 외부에서 오는 충격과 자극으로부터 태아를 보호하고, 세균 감염을 막으며, 또한 태아의 체온 조절을 도와준다.

- [9] 태아가 태어나기 전에 양수를 통하여 태아의 건강에 대한 여러 가지 정보를 알아보는 검사를 하는데, 이 때 임신이 시작되는 순간부터 출산 직후까지 모체에 해를 끼치지 않고 양수를 추출할 수 있다. 이렇게 검사에 사용된 세포는 검사 후 폐기하게 되는데 환자의 동의를 얻을 경우 폐기하지 않고 연구용 목적으로 사용할 수 있다. 따라서 양수 세포는 기존에 연구되어 오던 다른 성체줄기세포에 비해 쉽게 다량의 세포를 획득할 수 있다는 장점을 가진다. 그러나 아직까지 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 일정기간 동안 배양하여 배지를 추출하고 이를 섬유아세포에 넣어주었을 때 세포 성장을 증가시키는 현상이 일어나는지에 대해 개시된 바가 없다.

[10]

- [11] 한편, 머리털뿐만 아니라 인체의 모든 털은 일정한 성장기간이 지나면 성장이 정지되고 휴지기에 들어가서 탈모되고, 다시 털이 나는 과정을 되풀이하게 된다. 이것을 털의 성장주기라고 하는데, 머리털은 성장기가 1~6년 이상으로 길고 휴지기는 2~3개월 이하로 짧은 것으로 알려져 있다. 털은 하나씩 각각 독립된 성장주기를 가지며, 성인의 경우 머리털의 2~5%가 휴지기에 있으며, 휴지기에 들어간 털은 색소가 없고 윤기가 없으며 모근도 가늘고 빗질로도 쉽게 빠지게 된다. 그러나 이러한 정상적인 성장주기에 의해 휴지기에 들어가는 것 외에도 발열성 질병, 임신, 정신적 스트레스 등에 의해 성장기의 털이 갑자기 휴지기에 들어가 많이 빠지는 경우도 생기는데 이러한 경우는 원인이 제거되면 회복된다.

- [12] 대머리는 머리털이 빠져서 나지 않는 것이 아니고 점차 가늘어져 솜털로 되는 것이다. 털같이 하는 동물과 달리 사람의 모발은 각각의 독자적인 성장주기, 즉 성장기 -> 퇴행기 -> 휴지기 -> 성장기의 모주기(hair cycle)를 가지고 있기 때문에 털같이 없이 항상 일정한 모발의 수를 유지하게 된다. 그러나 대머리가 진행되면 모근에 존재하는 모유두가 작아지고, 모유두가 작아지면 머리털의 굵기도 가늘어지고 동시에 모주기도 짧아지며, 새로 자라나온 털은 더욱 가늘어지게 된다. 따라서 대머리가 진행되면 머리털은 솜털로 변하며 모주기는 더욱 짧아져 조금 자란 후 빠지게 된다. 대머리의 가장 큰 원인은 유전이고, 대머리 유전자의 발현에는 남성호르몬이 관여하는 것으로 알려져 있다. 대머리가 진행되면 두피에 기름이 많아져서 지루성 피부염이 잘 생기고, 모근에 부착되어 있는 피지선은 점차로 커지면서 피지를 많이 만들어 내는데, 이는 대머리의 원인이 아니고 대머리의 이차적인 현상이나 이러한 현상이 다시 탈모를 촉진시키는 원인이 된다.

- [13] 유전적으로 대머리가 아니더라도 노화, 스트레스 등으로 탈모현상이 일어나는 경우도 많다. 노화로 인한 탈모는 두피 세포의 감소와 두피 지방질의 축적량

증가에 따른 모공 폐쇄로 산소공급이 감소되고 그로 인해 모공 주위의 모세혈관이 압박을 받아 혈액 순환이 원활하게 이루어지지 않는 데에 그 원인이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 스트레스, 불규칙한 생활, 환경오염 등도 탈모현상을 일으키는 원인으로 생각되고 있다.

- [14] 대머리나 탈모현상으로 당사자들이 느끼는 정신적인 고통은 매우 크나, 아직까지 탈모현상을 치료할 수 있는 뚜렷한 방법이나 약품은 없다. 현재 개발되어 판매되고 있는 발모제들이 있으나 대부분 발모 효과가 일시적이거나 제한적이어서 사용자의 욕구를 충분히 만족시키지 못하고 있다. 어느 정도 효과가 검증되어 사용되고 있는 바르는 발모제인 미녹시딜은 혈관 확장작용에 의해, 경구용인 프로페시아는 피나스테라이드를 주제로 한 남성 호르몬의 활성화 억제작용에 의해 탈모방지 효과가 우수한 제제로 많이 이용되고 있다. 그러나 전술한 발모제들은 탈모의 방지에는 어느 정도의 효과를 나타내지만 발모와 관련된 효과는 미미하다. 즉, 상기 발모제들을 사용하다가 중단할 시에는 다시 탈모현상이 일어나게 되고, 장기 사용시에는 부작용의 우려가 크며, 또한 장기 사용에 따른 비용문제도 있어 대부분의 환자들이 치료를 포기하고 있는 실정이다.

[15]

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

- [16] 본 발명자들은 양수 내 태아 유래 세포에서 중간엽줄기세포를 분리하였으며 그 특징을 규명하였다. 또한, 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 이용하여 만든 컨디션드 배지에 어떠한 성분들이 있는지 밝히고 섬유아세포에서 컨디션드 배지의 효과를 확인하였다. 나아가, 본 발명자들은 마우스 인 비보(in vivo) 및 임상 실험을 통해 상기 컨디션드 배지 조성물이 모발의 밀도 및 발모 촉진 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[17]

[18]

#### 과제 해결 수단

- [19] 본 발명의 하나의 목적은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진 또는 탈모 방지용 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 다른 목적은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 배양하는 단계 및 상기 배양액을 수거하는 단계를 포함하는 상기 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[21]

#### 발명의 효과

- [22] 본 발명은 양수 내 태아유래 세포로부터 배양을 하여 다분화능이 있는 중간엽줄기세포를 얻을 수 있기 때문에 골수 중간엽줄기세포 이외의 또 하나의

원천이 가능하도록 한다. 그리고 산모에게서 얻은 양수 내 태아유래 세포를 가지고 다분화능의 특성을 가지는 중간엽줄기세포를 이용하여 로우 글루코즈 DMEM serum-free 배지, DMEM/F12-ITS bFGF 배지와 로우 글루코즈 DMEM serum free 배지로 컨디션드 배지를 만들어 발모촉진제의 생산을 제공할 수 있다. 즉, 본 발명은 양수 내 태아 유래 세포는 다분화성 중간엽줄기세포로서의 가능성을 제시하고 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포의 컨디션드 배지를 이용한 발모촉진제의 생산을 가능하게 한다.

[23]

### 도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 양수 내 태아 유래 세포주는 다양한 모양의 (heterogenous population; 화살표 표시) 형태를 나타내며 2~3번의 계대배양(sub-culture)을 통하여 동일한 모양(homogenous enrichment)의 중간엽줄기세포로 바뀌는 것을 나타낸 것이다.
- [25] 도 2는 산모에게서 분리한 양수 내 태아유래 세포의 핵형분석(karyotype)한 결과이다. 성염색체가 XY로 나왔으며 이것은 산모가 아닌 양수 내 태아에게서 유래된 것임을 보여주는 결과이다.
- [26] 도 3은 세포의 면역학적 표현형을 유세포 분석기를 통해 양수 내 태아유래 세포(B)가 인간 골수유래 중간엽줄기세포(A)와 비슷한 특징을 가지고 있음을 분석한 결과를 보여주는 것이다.
- [27] 도 4는 양수 내 태아유래 세포가 다분화능을 가진 골수유래 중간엽줄기세포와 비슷한 분화능을 가지고 있음을, 지방(A), 뼈(B), 연골(C)로의 분화를 통해서 확인한 결과를 보여주는 것이다.
- [28] 도 5는 확립된 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포를 이용하여 컨디션드 배지를 생산을 하기 위해 로우 글루코즈 DMEM serum-free 배지를 사용하였고(A), 또 다른 하나는 DMEM/F12-ITS bFGF를 사용하였다(B). 각각, 세포 모습을  $5 \times 10^4$  (a),  $1 \times 10^5$  (b),  $2.5 \times 10^5$  (c)와  $5 \times 10^5$  (d) 개의 세포 수에 따라 현미경으로 관찰한 모습을 나타낸 것이다.
- [29] 도 6은 확립된 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포로부터 컨디션드 배지의 생산을 통해 단백질 성분 분석을 이차원 전기영동(Two-dimensional electrophoresis)을 통해 다량의 성장인자가 생산되고 있는 것을 보여주는 것이다.
- [30] 도 7은 확립된 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포에서 얻은 조건별 컨디션드 배지에 존재하는 다량의 성장인자들이 섬유아세포의 성장에 미치는 효과를 보여주는 것이다.
- [31] 도 8은 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포에서 얻은 컨디션드 배지를 이용하여 인비오 상에서 발모촉진에 효과가 나타나는 것을 보여주고 있다.
- [32] 도 9는 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포에서 얻은 컨디션드 배지를 이용하여 임상실험을 통해 발모촉진에 효과가 나타나는 것을 보여주고 있다.
- [33]

## 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [34] 상기 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로서 본 발명은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진 또는 탈모 방지용 조성물에 관한 것이다.
- [35]
- [36] 본 발명에서 용어, "중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)"라 함은 연골, 뼈, 지방, 골수간질, 근육, 신경 등을 만드는데 원조가 되는 세포로서, 성인에서는 일반적으로 골수에 머물러 있지만 제대혈, 말초혈액, 기타 조직 등에도 존재하며, 이들로부터 수득할 수 있는 세포를 의미한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 중간엽줄기세포는 양수 내 태아 유래의 중간엽줄기세포를 의미한다.
- [37] 산모로부터 얻은 양수에는 태아의 몸으로부터 나온 여러 가지 화학물질들이 포함되어 인체에 있는 대부분의 세포를 생성할 수 있고 채취가 쉬운 편이다. 또한, 양수에는 이종(heterogenous) 모양의 세포들이 존재하는데, 본 발명자들은 그 중에서 중간엽줄기세포의 특징인 섬유아세포와 같은 모양을 가지는 동종(homogenous)의 중간엽줄기세포가 존재한다는 것을 확인하였다.
- [38] 본 발명은 양수 내 세포가 태아에서 유래하였음을 특징으로 한다.
- [39] 본 발명의 바람직한 양태로서, 양수 내 세포를 핵형분석을 통하여 태아에서 유래한 세포임을 확인이 가능하다. 양수에는 태아의 것 뿐만 아니라 산모의 세포도 일부 존재할 수 있어, 본 발명에서는 양수 내 세포가 태아에서 유래한 세포라는 것이 염색체 분석을 통하여 남성임을 확인함으로써 가능하였다 (도 2).
- [40] 바람직하게, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 트랜스페린(transferrin), 알파-2-에이치에스-글리코프로테인( $\alpha$ -2-HS-glycoprotein), 콜라게네이즈 및 매트릭스 메탈로프로테이즈(matrix metalloproteinases, MMPs)을 포함한다.
- [41]
- [42] 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포는 (a) CD13, CD29 및 CD44 에 대하여 모두 양성인 면역학적 특징을 나타내고 (b) 세포 배양 접시에 부착되어 성장하며 섬유아세포의 전형적인 모양인 선형(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, 및 (c) 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐을 특징으로 한다.
- [43] 본 발명에서 용어, "분화(differentiation)"란 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다. 다능성 중간엽줄기세포는 계통이 한정된 전구세포(예컨대, 중배엽성 세포)로 분화한 후, 다른 형태의 전구세포로 더 분화될 수 있고(예컨대, 골모세포 등), 그 뒤 특정 조직(예컨대, 뼈 등)에서 특징적인 역할을 수행하는 말기 분화세포(예컨대, 지방세포, 골세포, 연골세포 등)로 분화될 수 있다. 바람직한 양태로서, 본 발명의 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포는 지방세포(Adipocyte), 골세포(Osteoblast) 및

연골세포(Chondrocyte)로의 분화능을 가진다.

- [44] 본 발명의 구체적인 실시예로서, 상기 지방세포로의 분화 배지는 하이 글루코우즈 DMEM, 1 mM 덱사메타손(dexamethasone), 0.5 mM 3-아이소부틸-1-메틸-카페인(3-isobutyl-1-methyl-xanthine), 10 ng/ml 인슐린(insulin), 100 mM 인도메타신(indomethacin)과 10% FBS를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [45] 본 발명의 구체적인 실시예로서, 상기 골세포로의 분화 배지는 하이 글루코우즈 DMEM, 100 mM 덱사메타손(dexamethasone), 10 mM  $\beta$ -글리세로포스페이트, 0.2 mM 아스코르베이트와 10% FBS를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [46] 본 발명의 구체적인 실시예로서, 상기 연골세포로의 분화 배지는 하이 글루코우즈 DMEM, 0.1 M 덱사메타손(dexamethasone), 50g/ml AsA, 100 g/ml 소디움 피로베이트(sodium pyruvate), 40 g/ml 프롤린(proline), 10 ng/ml TGF-1과 50 mg/ml ITS프리믹스[6.25 g/ml 인슐린(insulin), 6.25 g/ml 트랜스페린(transferrin), 6.25 g/ml 셀레니어스 엑시드(selenium acid), 1.25 mg/ml BSA와 5.35 mg/ml 리놀레릭 엑시드(linoleic acid)]를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [47] 본 발명에서는 상기 각 분화별 배지에서의 양수 내 태아 유래의 중간엽줄기세포를 7일 내지 28일 동안 배양하였으며, 이러한 방법으로 양수 내 태아 유래 세포가 중간엽줄기세포의 성격을 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (도 4). 따라서, 본 발명에서는 양수 내 태아 유래 세포가 중간엽줄기세포의 성질을 가진 세포이며, 이를 골수 이외의 또 다른 세포의 원천으로 이용하는 것이 가능해진다.
- [48]
- [49] 본 발명의 조성물은 발모 촉진 또는 탈모 방지에 효과가 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “탈모 방지” 또는 “발모 촉진”은 동일한 의미로 사용되며, 이는 당업계에서 이용되는 또 다른 용어 양모 또는 육모 촉진과 동일한 의미를 가진다.
- [50] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 마우스와 랫트의 등의 털을 완전히 제거한 후 본 발명의 조성물을 붓으로 도포한 결과, 대조군에 비하여 본원 조성물을 도포한 처리군에서 발모가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 특히, 마우스의 경우 모발 생성시 피부 내에 멜라티노사이트가 생성되어 피부가 검게 변하는데, 본원 조성물을 도포한 처리구의 경우 대조군보다 더 짙은 피부색의 변화를 확인할 수 있었다 (도 8).
- [51] 또한, 임상실험에서 대머리 환자들에게 본원 조성물을 메조테라피 후 마이크로바늘로 자극을 주었더니 소형화(miniaturation)가 호전되고 모발의 밀도가 증가되며 굵기 또한 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 같은 방법으로 자극과 처리를 하여 모발의 밀도가 증가되고 모발이 굵어지며 탈모 부위가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (도 9).



[52]

[53] 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 화장료 조성물이다.

[54]

본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다. 또한, 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키기 위하여 피부 흡수촉진 물질을 추가로 포함할 수 있다. 특히, 발모제 조성물의 경우 유효성분인 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액 외에 모낭에 영양소를 공급할 수 있는 글루코오스, 키실로오스, 만노오스, 아라비노오스 등의 단당류 및 말토오스, 수크로오스, 셀로비오스, 트레할로오스 등의 이당류와 같은 당류들로부터 1종 이상을 추가로 더 포함할 수 있다.

[55]

본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[56]

본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트,

설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[57]

[58] 또한, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

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

[60] 본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 특히 발모제 조성물이므로 두피에 직접 도포하거나 또는 산포하는 등의 경피투여에 의해 사용된다.

[61] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은, 경구형 제형인 경우 성인 기준으로 0.1-100 mg/kg 의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있으며, 외용제인 경우에는 성인 기준으로 1일당 1.0 내지 3.0 ml의 양으로 1일 1 내지 5회 도포하여 1개월 이상 계속 하는 것이 좋다. 다만, 상기 투여량은 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[62] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡셀제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 연고, 크림등의 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등을 비롯하여 약제학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 사용할 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[63]

[64] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양액을 수거하는 단계를 포함하는 상기 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[65]

보다 바람직하게, 본 발명은 (a) 산모로부터 얻은 양수 내에서 태아 유래 세포를 분리하는 단계; (b) FBS 및 bFGF 함유 배지에서 계대배양하여 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 수득하는 단계; (c) 상기 수득된 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 무혈청 배지 또는 DMEM/F12-ITS(Insulin-Transferrin-Selenite) 복합 배지에 1일 내지 10일간 배양하여 컨디션드 배지를 제조하는 단계; 및 (d) 상기 컨디션드 배지 배양액을 수거하는 단계를 포함하는 상기 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[66]

[67]

상기 단계 (a) 에서, 양수는 임신이 시작되는 순간부터 출산 직후까지 모체에 해를 끼치지 않고 추출할 수 있다. 양수는 태아가 태어나기 전에 태아의 건강에 대한 여러 가지 정보를 알아보기 위한 검사에 이용되는데, 이렇게 검사에 사용된 후 폐기되는 세포들을 환자의 동의를 얻어 연구용 목적으로 사용할 수 있으므로 쉽게 다량의 세포를 획득할 수 있다. 산모로부터 얻은 양수를 원심분리하여 양수 내 태아 유래 세포를 분리할 수 있다.

[68]

상기 단계 (b) 에서는, 양수에서 분리한 세포들을 계대배양하여 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 수득할 수 있다. 계대배양에 사용되는 배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium: CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 최소 배지에는 예들 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12,  $\alpha$ MEM( $\alpha$  Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium) 및 IMEM( Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 또한 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin) 또는 겐타마이신(gentamicin) 등의 항생제를 포함할 수 있다.

[69]

본 발명에 있어서, 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포는 양수에서 분리한 세포들을 FBS 및 bFGF 를 함유하는 기본 배지에서 배양함으로써 수득할 수 있으며, 바람직하게는 10% FBS가 포함된 로우 글루코즈 DMEM 배지에 4ng/ml bFGF를 첨가하여 배양함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예로서, 상기 로우 글루코즈 DMEM 배지는 10% FBS, 1% L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토 마이신과 4ng/ml bFGF 용액을 추가로 포함할 수 있다.

[70]

상기 단계 (c) 에서는, 상기 수득된 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 무혈청 배지에 1일 내지 10일간 배양하여 컨디션드 배지를 제조한다.

[71]

본 발명에서 용어, "컨디션드 배지(conditioned medium)" 란 세포를 액체현탁배양하여 세포분열최성기인 대수성장기에 도달했을 때 분열세포를

원심분리 또는 여과하여 제거하고 배양액만 채취하여 이를 배양기질에 혼합한 배지를 말한다. 이는 분열중인 세포로부터 배지 내에서 추출되어 나오는 미지의 성장요소(growth factor)를 이용하는 것으로서, 저밀도의 세포 플레이팅이나 원형질체 배양에 많이 이용된다.

- [72] 본 발명의 목적상, 본 발명에서의 컨디션드 배지 조성물이란 태아 유래 중간엽줄기세포를 배양한 배지에서 태아 유래 중간엽줄기세포를 제거한 용액을 포함하는 조성물로서, 태아 유래 중간엽줄기세포에서 유래한 성장인자 등의 물질이 풍부하게 함유되어 있는 조성물을 말하며, 바람직하게는 트랜스페린(transferrin), 알파-2-에이치에스-글리코프로테인( $\alpha$ -2-HS-glycoprotein), 콜라게네이즈 및 매트릭스 메탈로프로테이즈(matrix metalloproteinases, MMPs) 을 포함한다.
- [73] 본 발명에서는 태아 유래 중간엽줄기세포의 컨디션드 배지를 얻기 위하여, 양수에서 분리하여 수득한 중간엽줄기세포를 아미노산 또는 그 유사체와 비타민 또는 그 유사체를 포함하는 Ham's F-12 영양소 혼합액을 함유하는 무혈청 배양배지를 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 Ham's F-12 영양소 혼합액을 함유하는 무혈청배지는 페놀 레드 등의 pH 지시약이 첨가되지 않은 DMEM을 기본으로 하고 Ham's F-12 영양소 혼합액을 대략 1: 0.5 ~ 2의 비율로 첨가한다. 이 때 L-글루타민 등의 산화영양원, 소듐 피루베이트 등 에너지 대사물질, 소듐 바이카보네이트 등의 탄소조절원을 첨가하는 것이 가능하다. 본 혼합액은 세포의 성장과 항상성 유지를 돕고 중간엽줄기세포의 초기배양 후 계대배양에 있어 세포의 안정성과 유지력 증진에 관여되는 여러 가지의 무기질과 아미노산들, 태아 유래 중간엽줄기세포에서 분비되는 성장인자의 더 높은 생산을 촉진할 수 있는 비타민 계열의 영양소들과 다른 인자들이 일정한 비율로 혼합하여 형성된다.
- [74] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 산모로부터 얻은 양수 내에서 분리한 태아 유래 세포를 FBS 및 bFGF 함유 배지에서 계대배양하여 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 수득한 후, DMEM/F-12 무혈청 배지 또는 DMEM/F12-ITS(Insulin-Transferrin-Selenite) 복합 배지에서 양수 세포의 수를 다르게 하여 3일 동안 배양하여 얻은 배양액을 원심분리 및 여과하여 컨디션드 배지를 제조하였다 (도 5).
- [75] 상기 단계 (d) 에서는, 상기 컨디션드 배지 배양액을 수거하여 본 발명에서 목적하는 피부 상태 개선용 조성물을 제조한다. 상기 컨디션드 배지 배양액의 수거는 당업계에 공지된 방법에 의하여 수행할 수 있으며, 원심분리 또는 여과하여 수거할 수 있다.
- [76]
- [77] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[78]

**발명의 실시를 위한 형태**

[79]

**실시예 1: 산모로부터 얻은 양수 내 태아유래 세포주의 배양 및 배양 조건을 이용한 동종의 중간엽줄기세포 모양을 확인**

[80]

산모로부터 얻은 양수 내에는 많은 부유물들이 많이 있다. 그것을 분리하기 위하여 양수를 T-flask에 담고 37°C에서 배양(incubation)을 하였다. 다음날 바닥에 붙은 세포만 제외하고 나머지는 제거를 하였다. 바닥에 붙은 세포를 트립신을 이용하여 바닥에서 분리를 시킨 후 원심분리를 하여 모은 후, 로우 글루코즈(low glucose) DMEM에 10% FBS, 1% L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신과 4ng/ml bFGF로 구성된 기본 배지에 재부유시켜 100mm 세포 배양 접시에 세포를 시딩하였다. 12~24시간 후 새 배지로 바꿔 주었다. 양수 내 태아유래 세포주는 다양한 형태의 모양을 (heterogenous population)가지며 2~3번의 계대 배양 후에는 한 가지의 섬유아세포 모양만을 가지게 됨을 확인할 수 있었다. 도 1과 같은 형태에서 배지는 2~3일에 한 번씩 바꿔주었으며 세포 밀도가 80~90%정도 일 때 계대 배양을 하였다.

[81]

[82]

**실시예 2: 핵형 분석을 통해 양수 내 태아유래 세포라는 것을 확인**

[83]

양수 내 태아유래 세포인지 알아보기 위해 핵형 검사를 하였다.

[84]

핵형분석은 염색체의 수, 크기, 모양 등을 핵형이라고 하며 태아의 염색체를 검사하여 염색체 돌연변이, 성별을 알 수 있다. 핵형분석을 하기 위해서 1~2시간 동안 콜세미드(Colcemid)로 세포 분열을 중기에 중지시키고 지 밴딩 염색법(G-banding staining)으로 관찰하여 염색체를 분석한다. 이렇게 핵형분석을 통해 알아본 결과, 양수 내 태아유래 세포는 정상염색체를 가지고 있고 성염색체가 XY로 나타나는 것으로 보아 산모가 아닌 태아에게서 유래된 세포임이 확인되었다 (도 2).

[85]

[86]

**실시예 3: 양수 내 태아유래 세포가 중간엽줄기세포와의 유사성 확인**

[87]

양수 내 태아유래 세포가 다분화성의 중간엽줄기세포의 특성을 가지고 있는지를 확인하였다.

[88]

먼저, 유세포 분석기를 통해서 면역학적 표현형을 분석한 후 양수 내 태아유래 세포가 사람 골수유래 중간엽줄기세포와 같이 비교하였을 때 CD13, CD29, CD44가 발현 되는 것을 확인하였다 (도 3). 그리고 이런 표면의 발현은 중간엽줄기세포에 특이적인 마커이긴 하지만 세포들마다 다른 특성들이 존재할 수도 있기 때문에 중간엽줄기세포의 성격을 나타내는 대표적인 특성인 뼈, 지방, 연골세포로의 분화능을 살펴보았다.

[89]

양수 내 태아유래 세포는 인간 골수유래 중간엽줄기세포와 마찬가지로 분화를 시킨 후, 양수 내 태아유래 세포는 인간 골수유래 중간엽줄기세포와 마찬가지로

분화를 시킨 후, 뼈는 골이 형성이 되면서 특이적으로 발현되는 유전자인 오스테오폰틴(osteopontin)과 오스테오칼신(osteocalcin)으로, 지방은 지방 형성에 관련된 유전자인 리포프로테인 리파아제(lipoprotein lipase ; LPL), 패틱 액시드 바인딩 프로테인 2(fatty acid binding protein ; aP2)와 페록시좀 프로리퍼레이터 액티베이터드 리셉터 감마(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ; PPAR $\gamma$ )로, 연골은 연골이 형성되면서 대표적인 유전자 타입 2 콜라겐(Type II collagen), 타입 1 콜라겐(Type I collagen)과 어그리칸(aggrecan)으로 분화가 되었다는 것을 역전사 연쇄반응(RT-PCR)으로 확인하였다. 뼈로 분화를 시키면 칼슘염의 생성되는 것을 확인하기 위해서 알리자린 레드 에스 염색법(Alizarin red S staining)으로, 지방으로 분화를 시키면 지방액포(Lipid droplet)가 생기고 이것을 염색을 하기 위해서 오일 레드 오 염색법(Oil red O staining)과 연골로 분화를 시키면 연골 특이적으로 분비하는 기질을 염색하기 위해서 알시안 블루 염색법(Alcian blue staining)을 이용하여 각 분화별 특이적인 염색법으로 확인하였다(도 4). 따라서 본 발명에서는 양수 내 태아유래 세포는 골수유래 중간엽줄기세포와 유사한 특성을 가지는 세포라는 것이 확인되었다.

[90]

[91] 실시예 4: 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포에서 조건별 컨디션드 배지 제조  
[92] 확립된 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포로부터 세포 수별 컨디션드 배지의 생산 조건을 확립하였다.

[93] 먼저, 확립된 중간엽줄기세포를 100mm 세포 배양 접시에서 트립신 처리를 하여 바닥에서 분리하였다. 떨어진 세포를 모아서 15ml 튜브에 담고 원심분리를 하였다. 모아진 세포를 5~10ml 배지에 풀어준 다음 잘 섞어 주었다. 튜브 안에 세포부유물 중 20 $\mu$ l를 혈구계산기(hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 측정 한 후, 로우 글루코즈 DMEM에 10% FBS, 1% L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신과 4ng/ml bFGF로 구성된 기본 배지에 5x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 2.5x10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> 개의 세포를 100mm 세포 배양 접시에 시딩하였다. 12시간 후, 컨디션드 배지인 로우 글루코즈 DMEM serum-free 배지와 DMEM/F12-ITS bFGF 배지로 바꿔주고 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후, 각각의 수별 배양액을 튜브에 옮겨 담은 후 원심분리를 하고 0.20시린지 필터(syringe filter)를 하여 컨디션드 배지를 생산하였다(도 5).

[94]

[95] 실시예 5: 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포에서 조건별 컨디션드 배지 성분 확인

[96] 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포를 이용하여 얻은 컨디션드 배지의 성분을 분석하기 위하여 이차원 전기영동(Two-dimensional electrophoresis)을 이용하여 어떠한 단백질들이 발현되는지를 보고 그 양의 변화를 측정하였다. 전기영동을 한 후 코마시 블루 염색(Colloidal Coomassie blue staining) 또는 실버 염색(silver staining)으로 젤 상에서 여러 개의 단백질 스팟(protein spot)을 확인할 수 있었다.

컨디션드 배지의 성분을 분석한 결과 골수로 철을 운반하는 단백질인 트랜스페린(transferrin), 세포 재생을 빠르게 해주는 알파-2-에이치에스-글리코프로테인(alpha-2-HS-glycoprotein), 콜라게네이즈, 매트릭스 메탈로프로테이즈(matrix metalloproteinases ; MMPs)와 많은 성장요소 인자들이 함유되어 있는 것으로 분석되었다(도 6).

[97]

[98] 실시예 6: 인비트로(in vitro) 상에서 컨디션드 배지 효과 확인

[99] 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포를 이용하여 세포 수를 세어  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  개로 각각의 로우 글루코즈 DMEM serum-free 배지와 DMEM/F12-ITS bFGF 배지로 바꿔 주어 3일 동안 배양하여 컨디션드 배지를 만들어 섬유아세포의 성장에 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 하였다. 섬유아세포를 24well에  $1 \times 10^4$  개씩 시딩하고 12시간 후, 컨디션드 배지로 바꿔주고 3일 동안 실험을 진행 하였다. 실험이 끝나면 각각의 24well에서 컨디션드 배지를 제거하고 2번 PBS로 워싱(washing)을 하고 10% 포르말린(formalin)을 사용하여 세포를 고정시킨 후, 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 이용하여 염색(staining)을 하였다. 흐르는 물에 염색액을 제거하고 24시간 정도 말린 후, 염색한 것을 10% 아세트산(acetic acid)으로 디스테이닝(destaining)을 통하여 흡광도를 측정하여 값을 측정하였다. 컨디션드 배지가 아닌 로우 글루코즈 DMEM serum-free 배지와 DMEM/F12 ITS-bFGF 배지에서 자란 세포보다 로우 글루코즈 DMEM serum-free 컨디션드 배지는 40~60%, DMEM/F12 ITS-bFGF 컨디션드 배지는 20~30% 정도의 성장이 촉진되었음을 확인할 수 있었다 (도 7).

[100]

[101] 실시예 7: 인비보(in vivo) 상에서 컨디션드 배지가 미치는 효과를 확인

[102] 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포를 이용하여 세포 수를 세어  $5 \times 10^5$  개로 로우 글루코즈 DMEM-bFGF 배지로 바꿔 주어 3일 동안 배양하여 컨디션드 배지를 만들어 인비보 상에서 컨디션드 배지가 발모촉진을 시키는데 있어서 영향을 미치는지 살펴보았다. 마우스(C57BL6)와 랫트(SD)에서 각각 실험을 진행하였다. 두 종류의 동물들의 등쪽 하체 부분을 척추를 기준으로 양쪽으로 직사각형 모양으로 털을 제거하였고 이를 위해 뿌리까지 제거할 수 있는 제거제를 사용하여 완전히 제거해 주었다. 대조구는 컨디션드 배지가 아닌 일반 로우 글루코즈 DMEM serum-free 배지를, 처리구는 컨디션드 배지를 매일 1회 모발이 제거된 부위에 붓을 이용하여 도포 하였다. 12일 후, 대조구와 처리구의 발모 상태를 확인한 결과 컨디션드 배지가 아닌 일반 배지에 비하여 컨디션드 배지를 도포한 처리구의 모발의 발모가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 특히, 마우스(C57BL6)의 경우 모발 생성 시 피부 내에 멜라노사이트가 생성되어 피부가 검게 변하게 되는데, 컨디션드 배지를 도포한 처리구의 경우 컨디션드 배지가 아닌 일반 배지를 도포한 대조구보다 더 짙은 피부색의 변화를 확인할 수

있었다(도 8).

[103]

[104] 실시예 8: 임상에서 컨디션드 배지가 미치는 효과를 확인

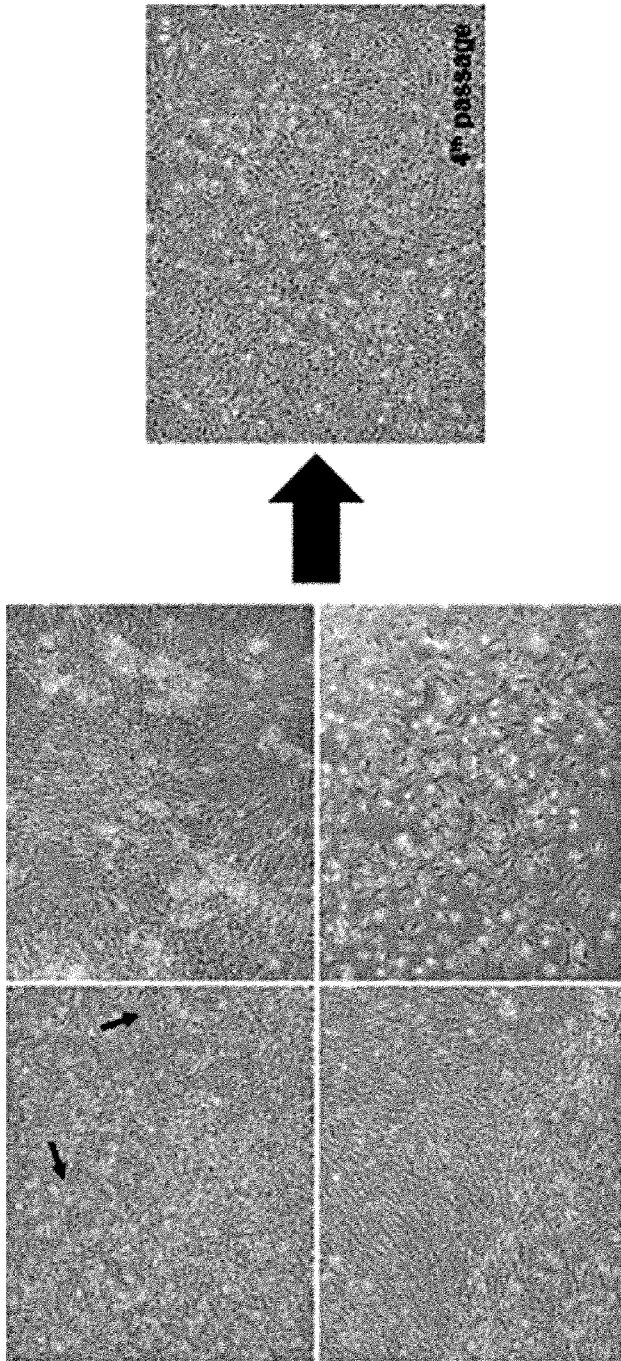
[105] 양수 내 태아유래 중간엽줄기세포를 이용하여 세포 수를 세어  $5 \times 10^5$  개로 로로우 글루코즈 DMEM-bFGF 배지로 바꿔 주어 3일 동안 배양하여 컨디션드 배지를 만들어 컨디션드 배지가 아닌 일반 배지와 비교하여 임상에서 컨디션드 배지가 발모촉진에 영향을 미치는지 살펴보았다. 임상실험에서 대머리 환자들에게 주 1회씩 컨디션드 배지를 메조테라피 후 마이크로바늘로 자극을 주었다. 8~15주 후 관찰하였을 때, 소형화(Miniaturation)가 호전되고 모발의 밀도가 증가되며 굵기 또한 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(도 9A). 같은 방법으로 자극과 처리를 하여 모발의 밀도가 증가되고 모발이 굵어지며 탈모 부위가 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(도 9B).



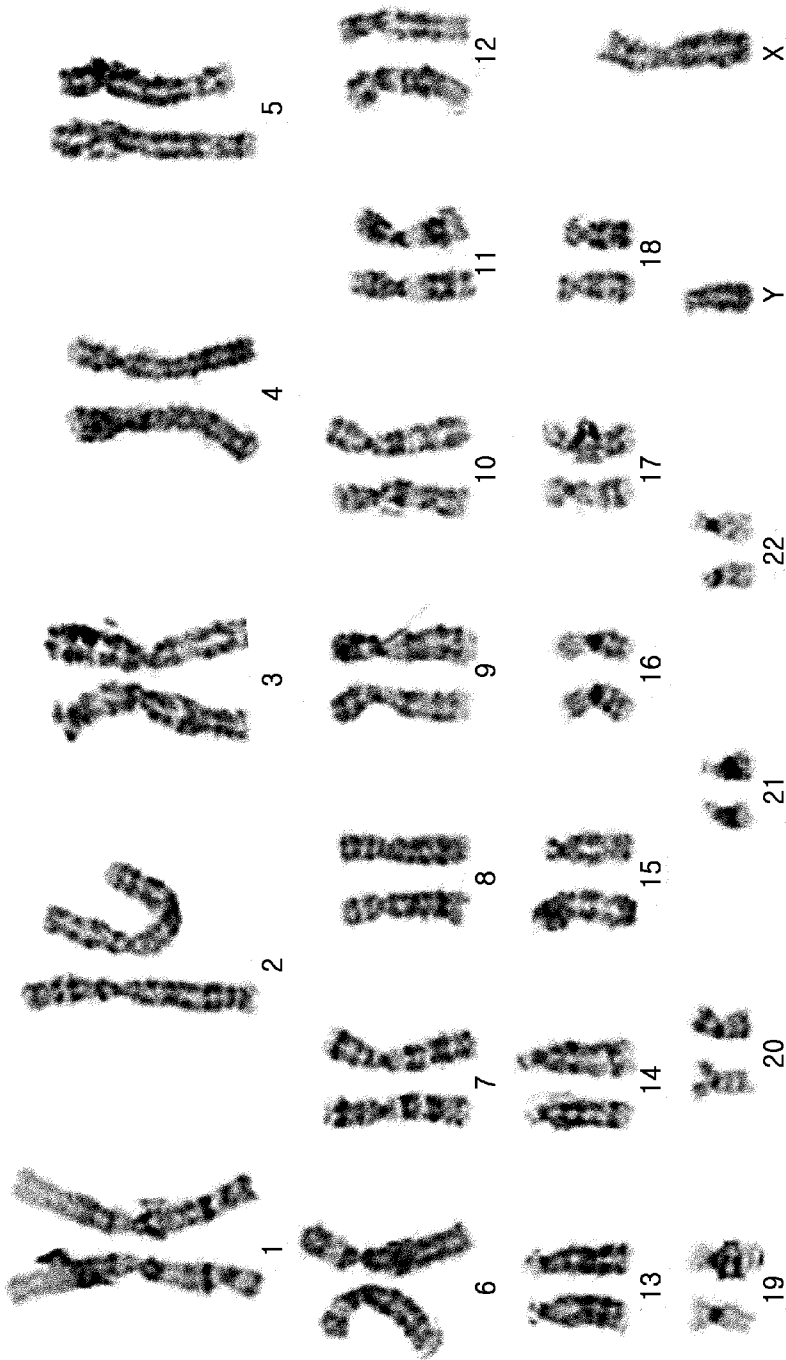
## 청구범위

- [청구항 1] 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진 또는 탈모 방지용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포는 다음과 같은 특성을 나타냄을 특징으로 하는 조성물.:
- (a) CD13, CD29 및 CD44 에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타냄;
  - (b) 세포 배양 접시에 부착되어 성장하며, 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타냄; 및
  - (c) 중배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포의 배양액은 트랜스페린(transferrin), 알파-2-에이치에스-글리코프로테인( $\alpha$ -2-HS-glycoprotein), 콜라게네이즈 및 매트릭스 메탈로프로테아제(matrix metalloproteinases, MMPs)를 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 배양하는 단계; 및 상기 배양액을 수거하는 단계를 포함하는, 제1항의 조성물을 제조하는 방법.
- [청구항 8] (a) 산모로부터 얻은 양수 내에서 태아 유래 세포를 분리하는 단계;
- (b) FBS 및 bFGF 함유 배지에서 계대배양하여 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 수득하는 단계;
- (c) 상기 수득된 양수 내 태아 유래 중간엽줄기세포를 무혈청 배지 또는 DMEM/F12-ITS(Insulin-Transferrin-Selenite) 복합 배지에 1일 내지 10일간 배양하여 컨디션드 배지를 제조하는 단계; 및
- (d) 상기 컨디션드 배지 배양액을 수거하는 단계를 포함하는, 제1항의 조성물을 제조하는 방법.

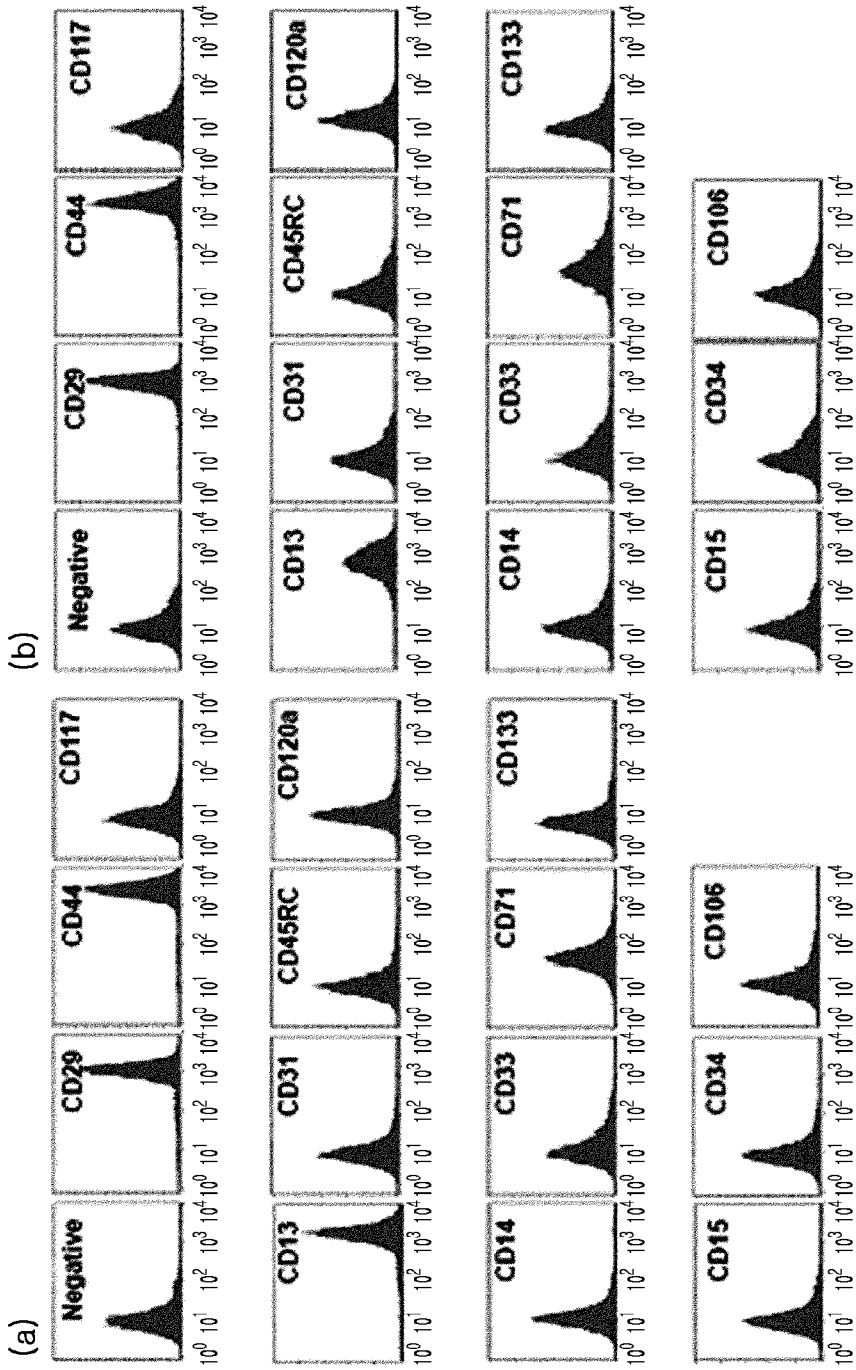
[Fig. 1]



[Fig. 2]

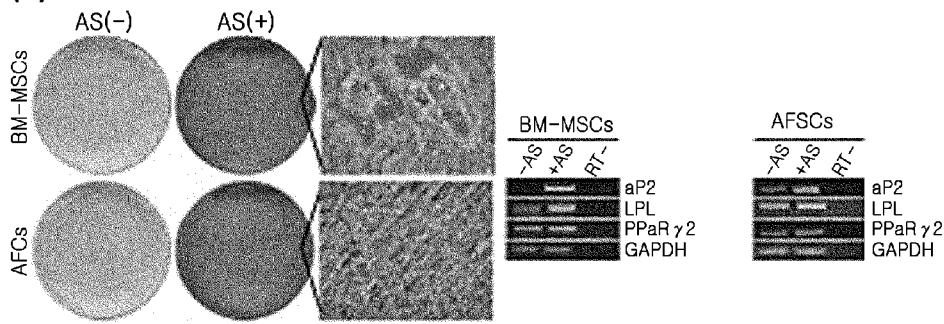


[Fig. 3]

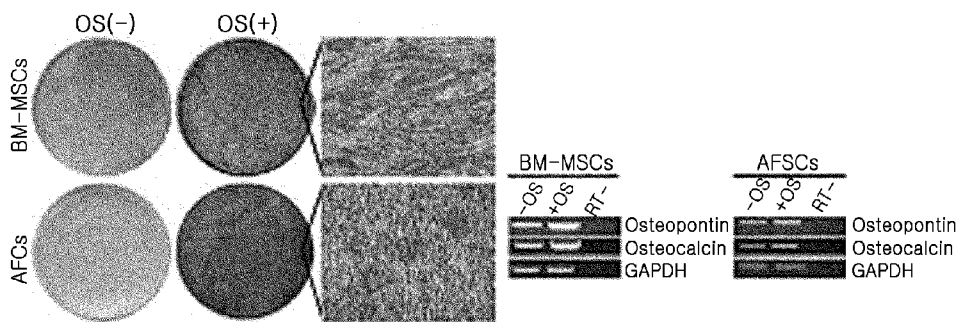


[Fig. 4]

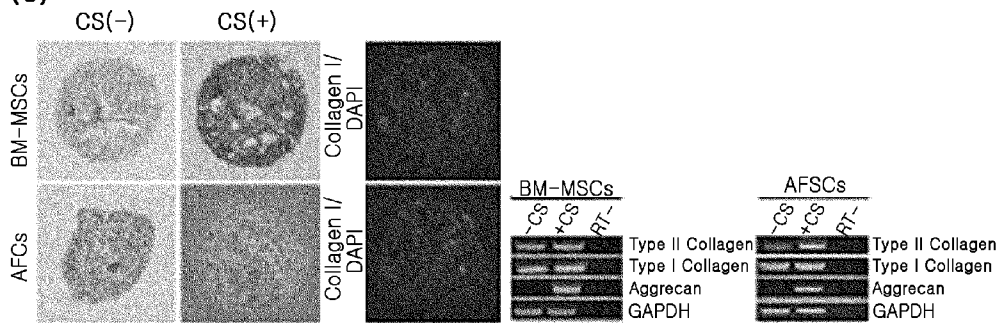
(a)



(b)

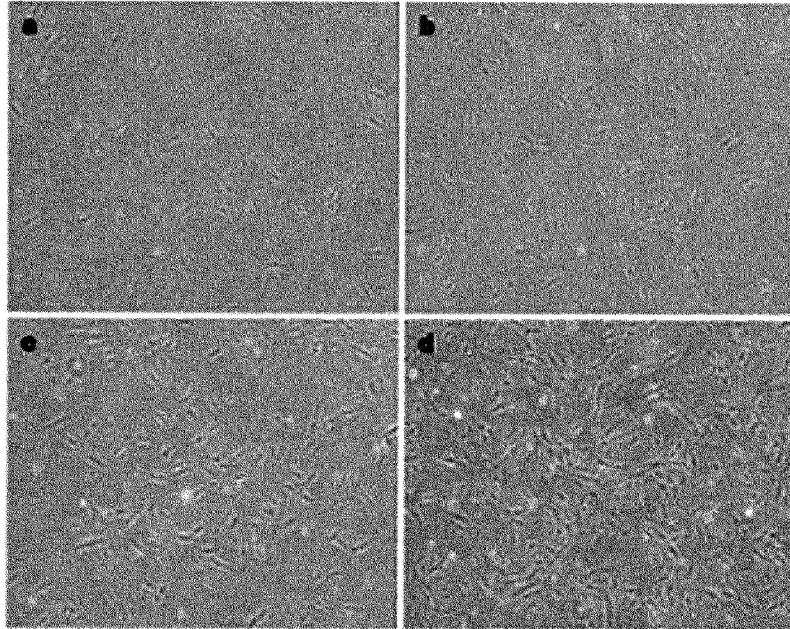


(c)

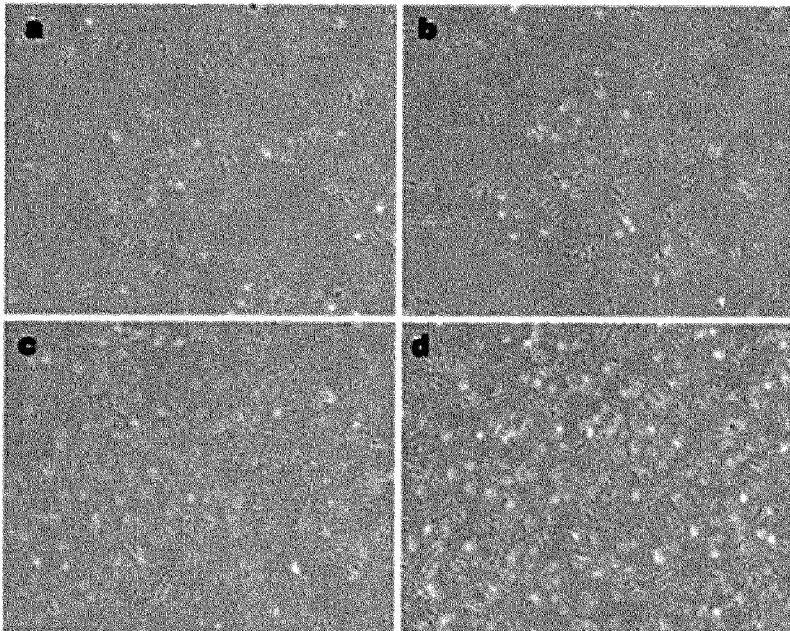


[Fig. 5]

**A**

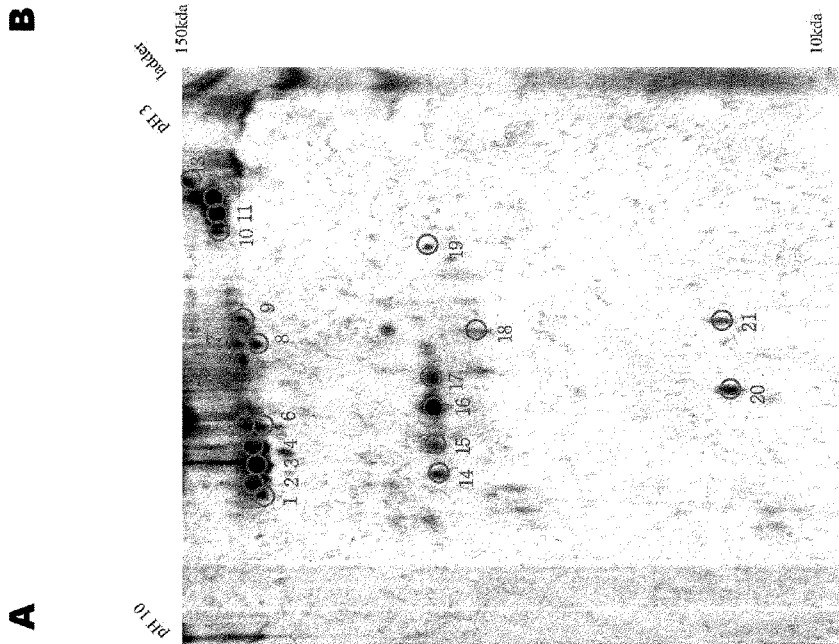


**B**

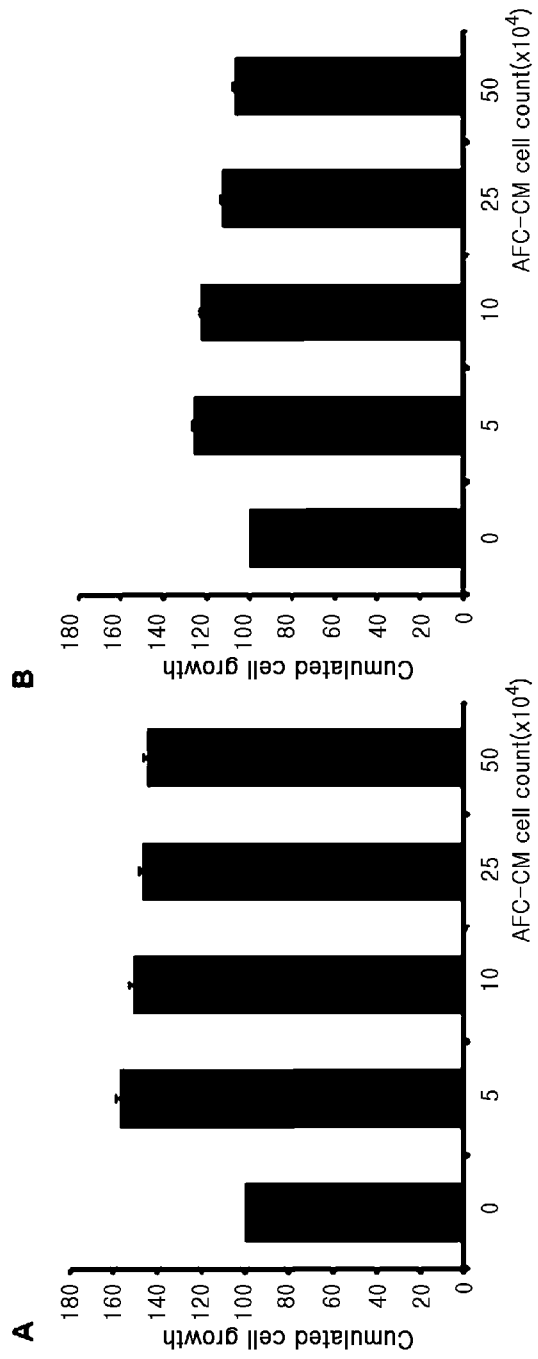


[Fig. 6]

Spot no.	Target protein	Exp. M. (kDa)	Exp. M. (pI)	Coverage (%)
1	transferrin [Homo sapiens]	79.34	7.1	27
2	AF119094_2PRO1400 [Homo sapiens]	79.31	6.9	35
3	skin collagenase precursor	54.25	6.6	37
4	MMP1_HUMAN Interstitial collagenase precursor (Matrix metalloproteinase-1)	54.16	6.5	36
5	matrix metalloproteinase-1 preproprotein [Homo sapiens]	54.16	6.5	39
6	matrix metalloproteinase-1 preproprotein [Homo sapiens]	54.16	6.5	35
7	transferrin [Homo sapiens]	79.31	6.9	40
8	transferrin [Homo sapiens]	79.31	6.9	24
9	transferrin [Homo sapiens]	79.31	6.9	41
10	tripeptide motif-containing-2 [Homo sapiens]	82.54	6.5	11
11	AF193404_1 unknown [Homo sapiens]			40
12	kinesin-like motor protein KIF1C [Homo sapiens]	123.91	6.3	10
13	alpha-2-HS-glycoprotein [humanized, Bos taurus]	144.25	5.3	25
15	A Chain A, Crystal Structures Of Mutant (K296a) That Abolish The Dihydrone Interaction In The N-Lobe Of Human Transferrin	37.39	6.5	38
16	A Chain A, Crystal Structures Of Mutant (K296a) That Abolish The Dihydrone Interaction In The N-Lobe Of Human Transferrin	37.39	6.5	44
17	A Chain A, Crystal Structures Of Mutant (K296a) That Abolish The Dihydrone Interaction In The N-Lobe Of Human Transferrin	37.39	6.5	38
18	hypothetical protein [Homo sapiens]	42.24	8.6	17
19	MMP1_HUMAN Interstitial collagenase precursor (Matrix metalloproteinase-1) (MMP-1) (Fibronectin collagenase) (Contains: 22 kDa interstitial collagenase; 27 kDa interstitial collagenase)	54.16	6.5	17

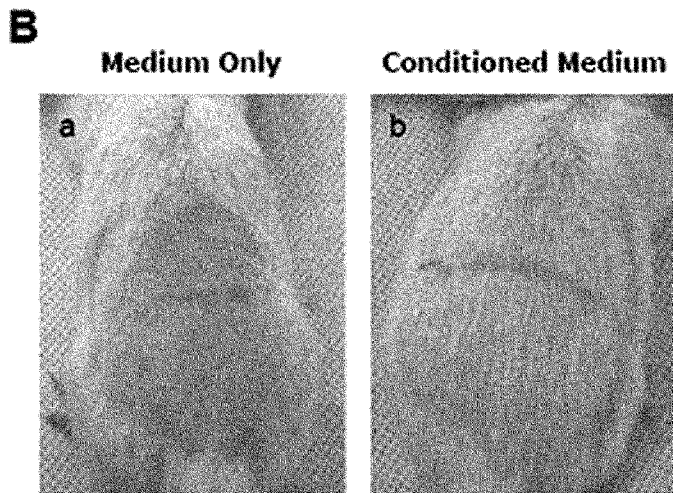
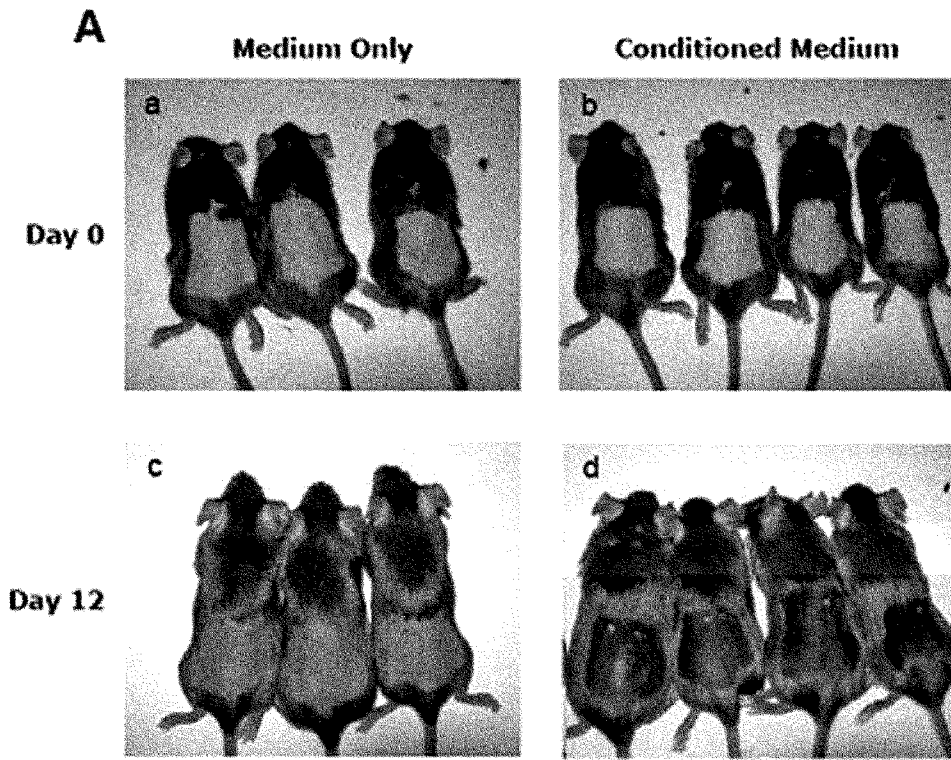


[Fig. 7]





[Fig. 8]



[Fig. 9]

