

명세서

발명의 명칭: 중간엽 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 하는 섬모 발생 촉진용 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 2020년 3월 26일자 한국 특허 출원 제10-2020-0036871호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [2] 본 발명은 중간엽 줄기세포 또는 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 하는 섬모 발생 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 줄기세포는 다양한 세포로 분화할 수 있으므로, 이러한 줄기세포의 특성을 이용한 세포치료법의 활용가능성에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 다분화능이 있는 배아줄기세포는 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력 때문에 세포치료제로 주목받았지만, 안전성 및 윤리적 문제로 실제 활용되기에는 어려움이 있다.
- [5] 이러한 안전성 및 윤리적인 문제를 회피하기 위하여 많은 연구자들은 배아줄기세포의 대안으로 성체줄기세포에 관심을 가지게 되었다. 성체 줄기세포는 미분화 상태로 자가 증식하고 다른 조직의 세포로 다중 분화될 수 있는 세포로서, 가장 먼저 알려진 것은 골수에서 유래한 골수줄기세포(bone marrow stem cells, BMSCs)이나, 이후 태줄, 혈액, 지방 등 우리 몸의 다양한 부위에 존재한다는 것이 알려져 있다.
- [6] 이들 성체줄기세포 중 높은 자기복제능력과 더불어 다양한 조직으로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [7] 중간엽 줄기세포는 분화를 통해 근육, 연골, 뼈 조직, 인대, 골수 기질 등에 대한 재생능력을 가진다. 또한, 중간엽 줄기세포 그 자체가 분비하는 다양한 단백질들의 작용을 통해 병변 부위에서의 항상성 회복(염증억제, 혈관생성, 세포유인, 면역조절 등)을 유도한다. 이를 중간엽 줄기세포의 주변분비 작용(paracrine)이라 한다. 이러한 주변분비 작용 때문에 중간엽 줄기세포를 'Drug Store' 혹은 'Drug Factory'라 칭하고 있다.
- [8] 섬모(cilia)는 세포 표면에 머리카락과 같이 솟아 있는 세포의 소기관으로서, 인체를 포함하는 동물의 대부분의 세포에 존재하지만, 중요 기능을 하지 않는 흔적기관으로 오랫동안 알려져 있었다. 하지만, 섬모가 SHH(sonic hedgehog), PDGF(platelet-derived growth factor), Wnt, Notch와 같은 생체 내 조직 항상성 유지에 결정적인 성장인자(growth factor)의 신호 전달 및 세포주기를 조절할 뿐 아니라, 후각, 미각, 삼투압 등의 화학 감각 및 시각, 청각 등의 물리적 감각을

감지 및 신호체계를 총괄하는 생체신호 입출력 허브와 같은 역할을 한다는 사실이 알려지면서 섬모에 대한 관심이 집중되고 있다.

[9]

[10] 구체적인 섬모의 역할에 대해서는 다음 표 1에 기재된 바와 같다.

[11] [표1]

조직 및 세포 타입	섬모세포소기관의 역할
공통기능	Hedgehog, PDGF, Wnt 등의 성장인자 신호전달, 세포주기 조절
Embryonic Node	유체의 흐름과 심호전달 물질 감지
신장, 담관, 췌장	유체의 흐름 감지
Inner ear sensory hair cells	소리를 감지하는 Stereo cilia를 생성 유지함(Kino cilia의 기능)
광 수용 세포	Outer segment에 변형된 로돕신이 위치함
청신경	소리 감지
조골세포/연골세포	뼈 및 연골에 전해지는 압력을 감지하는 것으로 추정
정자	정자의 이동 관여
기관지의 표피조직	점액배출
난관	착상을 위해 수정란의 이동을 조절하는 것으로 추정

[12]

[13] 소위 '섬모형성이상(ciliopathy)'라 불리는 섬모 장애질환은 비정상적인 세포 섬모의 기능이나 구조로 인해 야기되는 질환을 통칭한다.

[14] 구체적으로는 바데트-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrom; BBS), 주버트 증후군(Joubert syndrome), 맥켈-그루버 증후군(Meckel-Gruber syndrome), 또는 레버 선천성 흑내장(Leber congenital amaurosis), 알스트롬 증후군(Alstrom syndrome) 등의 유전질환 뿐 아니라, 다낭성 신장질환(polycystic kidney disease; PKD), 신장 낭종(renal cysts), 불임(sterility), 호흡기 질환(respiratory disorder), 내장역위증(situs inversus), 암, 및 당뇨(diabetes), 비만(obesity), 고혈압(hypertension)과 같은 대사성 질환 등 다양한 형태로 나타난다. 하지만, 아직까지 본 질환들의 치료제는 개발된 바 없다.

[15] 상기 섬모형성이상 질환의 구체적 증상들로는 바데트-비들 증후군과 알스트롬 증후군에서 비만증이 발생하고, 사람의 유전성 섬모장애질환과 유사하게 섬모 생성장애를 가진 생쥐에서도 비만증과 과식증이 발생하는데, 그 이유는 시상하부 뉴런에서 식욕억제 호르몬인 렙틴(leptin) 작용 저하로 알려져 있다.

[16] 또한, 피부에서 섬모가 없으면 헤어의 생성이나 각질의 분화가 억제된다는 보고가 있으며, 피부 색소 생성과 관련하여 일차 섬모가 SHH(sonic

hedgehog)-smoothened-GLI2 신호 전달에 의해 활성화되면 멜라닌 생성이 억제된다는 것이 알려져 있다.

- [17] 최근 섬모의 다양한 기능이 알려지면서, 당뇨, 비만, 고혈압 등 난치성 대사 질환의 발병과 관련하여 섬모장애로 인한 전신 대사의 항상성의 불균형을 한 원인으로 생각하고 있을 뿐 아니라, 섬모의 기능회복이 대사성 질환을 비롯한 다양한 질환의 치료를 위한 타겟으로 대두되고 있다.

[18]

[19] [선행기술문헌]

[20] (특허문헌 1)KR 10-2020-0000415

[21] (특허문헌 2)KR 10-2056172

[22]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [23] 본 발명은 중간엽 줄기세포 혹은 중간엽 줄기세포 배양액을 이용한 섬모 발생 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [24] 본 발명은 중간엽 줄기세포 혹은 중간엽 줄기세포 배양액을 이용한 섬모 생성 이상으로 발생하는 질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [25] 본 발명의 다른 목적은 중간엽 줄기세포 혹은 중간엽 줄기세포 배양액을 이용한 섬모 발생 촉진을 통해 헤어의 생성 촉진, 각질의 분화 촉진, 멜라닌 생성 억제 기능을 유도하는 화장용 조성물을 제공하는 데 있다.

[26]

과제 해결 수단

- [27] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 섬모 발생 촉진용 조성물을 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 개체에 투여하여 섬모 형성 이상으로 야기되는 질병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [29] 본 발명은 중간엽 줄기세포를 포함하는 섬모 발생용 조성물을 제공한다.
- [30] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포를 개체에 투여하여 섬모 형성 이상으로 야기되는 질병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [31] 본 발명은 중간엽 줄기세포와 섬모를 발생할 수 있는 세포를 공동배양함으로써 섬모 발생을 유도하는 방법을 제공한다.
- [32] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포와 섬모를 발생할 수 있는 세포 또는, 섬모 발생에 이상이 있는 세포를 체외에서 공동배양함으로써 섬모 발생을 유도하여, 공동배양된 섬모를 발생할 수 있는 세포 또는 섬모 발생에 이상이 있는 세포를 개체에 투여하여 섬모 형성 이상으로 야기되는 질병을 치료하는 방법을 제공한다.
- [33] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 피부 미백,

및/또는 피부 각질 세포의 섬모발생을 유도하는 화장료 조성물을 제공한다.

- [34] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 포함하는 화장료 조성물을 피부에 도포 또는 처리하여 피부 미백, 및/또는 피부 각질 세포의 섬모발생을 유도하는 방법을 제공한다.

[35]

발명의 효과

- [36] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물을 세포에 처리하였을 때 섬모 길이가 증가된 것으로 확인함으로써 상기 배양액을 섬모 장애질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.
- [37] 본 발명의 중간엽 줄기세포와 섬모 장애를 가지는 세포를 공동배양하였을 때 세포의 섬모를 신장시킴으로써 기능이 회복된 세포 및/또는 중간엽 줄기세포는 섬모 장애 질환의 치료에 사용할 수 있다.
- [38] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양액을 유효성분으로 포함하는 조성물을 세포에 처리하였을 때 섬모 길이가 증가된 것으로 확인함으로써 상기 배양액을 피부 각질세포의 섬모발생을 유도하는 화장료 조성물로 사용할 수 있다.

[39]

도면의 간단한 설명

- [40] 도 1은 RPE 세포주에 실시예 1의 방법으로 분리 제조된 다양한 유래의 중간엽 줄기세포의 배양액(10X)을 처리했을 때 일차 섬모 발생 결과이다. 도 1A는 각각의 처리군에서 생성된 섬모의 모양을 형광염색(핵 및 섬모 이중 염색) 후 형광현미경으로 관찰한 결과이고, 도 1B는 각각의 처리군에서의 섬모 발생 및 섬모의 길이를 측정한 결과이다.
- [41] 도 2는 RPE/Smo-GFP 세포주에 실시예 1의 방법으로 분리 제조된 다양한 유래의 중간엽 줄기세포의 배양액을 다양한 농축 정도(1X, 2X, 5X)로 처리했을 때 일차 섬모 발생 결과이다. 도 2A는 각각의 처리군에서의 세포의 모양을 형광현미경으로 관찰한 결과이고, 도 2B는 각각의 처리군에서의 섬모 발생 및 섬모의 길이를 측정한 결과이다.
- [42] 도 3은 RPE 세포주 및 실시예 1에서 분리된 다양한 유래의 중간엽 줄기세포를 공동배양했을 때, RPE 세포주에서의 일차 섬모 발생 결과이다. 도 3A는 각각의 중간엽 줄기세포와 공동배양으로 생성된 섬모의 모양을 형광염색(핵 및 섬모 이중 염색) 후 형광현미경으로 관찰한 결과이고, 도 3B는 각각의 처리군에서의 섬모 발생 및 섬모의 길이를 측정한 결과이다.

[43]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 통상의 지식을 가진 사람에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이

본 발명의 요지를 불필요하게 제한할 수 있다고 판단되는 경우에는 그 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로써, 사용자, 실시자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

- [45] 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 '포함'한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [46] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 포함하는 섬모발생용 조성물을 제공한다.
- [47] 본 발명은 중간엽 줄기세포를 포함하는 섬모발생용 조성물을 제공한다.
- [48] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 포함하는 섬모 형성 이상증 또는 섬모 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [49] 본 발명은 중간엽 줄기세포를 포함하는 섬모 형성 이상증 또는 섬모 손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [50] 본 발명은 중간엽 줄기세포와 섬모 이상 세포를 체외(*Ex vivo*)에서 공동배양하여 섬모 이상 세포에서 섬모 발생을 유도하는 방법을 제공한다.
- [51] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [52] 상기 '섬모형성이상증(ciliopathy)'은 비정상적인 세포 섬모 또는 섬모의 기능이나 구조로 인해 야기되는 질환을 모두 통칭한다. 본 명세서에서는 '섬모형성이상증'과 '섬모 형성 이상'으로 야기되는 질병'이 같은 의미로 사용된다.
- [53] 상기 섬모형성이상증은 보통 운동성, 비운동성 섬모 또는 중심체(centrosome)에 국지화되는 단백질과 연관되어 있는 것으로 알려져 있으며, 유전적 결손에 의해 유발되는 특성으로 인한 것으로 알려져 있지만, 관련 질환 유전자들에 대해 완벽히 알려져 있지 않으며, 본 질환의 치료제 역시 아직까지 개발된 바 없다.
- [54] 상기 섬모형성이상증은 비정상적인 세포 섬모의 기능이나 구조로 인해 야기되는 질병이면 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 주버트 증후군(Joubert syndrome), 바르테-비들 증후군(Bardet-Biedl syndrome), 콩팥황폐증(Nephronophthisis), 맥켈-그루버 증후군(Meckel-Gruber syndrome), 또는 레버 선천성 흑내장(Leber congenital amaurosis), 다낭성 신장질환(polycystic kidney disease; PKD), 신장 낭종(renal cysts), 불임(sterility), 호흡기 질환(respiratory disorder), 내장역위증(situs inversus), 비만(obesity), 고혈압(hypertension) 및 암질환 등일 수 있다.
- [55] 상기 섬모 형성 이상 또는 섬모 손상 세포는 섬모상피세포, 망막세포, 피부세포, 청각세포에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [56] 본 발명에서 사용하는 용어 '줄기세포(stem cell)'란 자기 복제 능력을 가지면서 두 종 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 상기 줄기세포는

성체줄기세포, 만능줄기세포, 유도만능줄기세포 또는 배아줄기세포를 포함한다. 상기 '성체 줄기세포'는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다

- [57] 본 발명에서 용어 '중간엽 줄기세포'는 뼈, 연골, 지방, 힘줄, 신경 조직, 섬유아세포 및 근육 세포 등 구체적인 장기의 세포로 분화되기 전의 중간엽 유래의 만능 전구 세포를 말한다. 본 발명에서 중간엽 줄기세포는 분화되지 않은 상태로 조성물 중에 함유된다. 본 발명의 중간엽 줄기세포는 인간 탯줄(cord), 와튼 젤리(wharton's jelly), 제대혈, 태반, 지방 조직, 골수, 편도, 인간의 배낭(embryonic yolk sac), 제대, 피부, 말초혈액, 근육, 간, 신경 조직, 골막, 태아막, 활액막, 활액, 양막, 반월상연골, 전십자 인대, 관절 연골세포, 유치, 혈관주위세포, 지주 골, 슬개골하 지방과, 비장 및 흉선 등에서 유래할 수 있다. 바람직하게는 인간 탯줄(umbilical cord), 와튼 젤리(wharton's jelly), 제대혈, 태반, 지방, 골수 및 편도로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 유래할 수 있고, 바람직하게는 인간 탯줄(umbilical cord), 와튼 젤리(wharton's jelly), 제대혈(umbilical cord blood), 또는 지방 조직(adipose tissue)에서 유래하지만, 그 유래를 제한하지 않는다.
- [58] 또한, 상기 중간엽 줄기세포는 바람직하게는 인간으로부터 유래하지만, 태아 또는 인간을 제외한 다른 포유동물로부터 유래될 수도 있다. 상기 인간을 제외한 다른 포유동물은 개과 동물, 고양이과 동물, 원숭이과 동물, 소, 양, 돼지, 말, 랫트, 마우스 또는 기니피그 등일 수 있으며, 그 유래를 제한하지 않는다.
- [59] 본 발명에서 '지방 유래 중간엽 줄기세포(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; AM)'라 함은 인간 지방조직으로부터 분리된 것일 수 있다. 적합한 인간 지방조직은 성숙한 지방세포와 이를 둘러싼 결합조직을 포함하는 것을 의미할 수 있다. 개체의 체내 위치에 상관없이 지방을 채취할 때 사용되는 모든 방법에 의하여 수득되는 모든 지방조직을 사용할 수 있다.
- [60] 본 발명에서, '태반-유래 중간엽 줄기세포(placenta-derived mesenchymal stem cells; PLM)'라 함은 태반으로부터 분리된 줄기세포를 모두 포함하며, 바람직하게는 체외로 분리된 인간의 태반으로부터 분리된 4종류의 줄기세포, 즉 (1) 양막 상피세포(human amniotic epithelial cells, hAEC), (2) 양막에서 유래한 중간엽 줄기세포(human amniotic mesenchymal stromal cells 또는 human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSC), (3) 융모막 중간엽 줄기세포(human chorionic mesenchymal stromal cells 또는 human chorionic mesenchymal stem cells, hCMSC), 및 (4) 융모 영양막 세포(human chorionic trophoblastic cells, hCTC)를 포함한다.
- [61] 본 발명에서 '제대혈-유래 줄기세포(umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells; UCBM)'는 분만 후 제대에 존재하는 줄기세포 중 혈액 줄기세포를 제외한 중간엽 줄기세포만을 의미한다.
- [62] 본 발명에서, '제대-유래 줄기세포(wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells; WJM)'라 함은 제대로부터 분리된 줄기세포를 모두 포함하며, 포유류의

태아가 태반에서 성장할 수 있도록 모체와 배를 연결해주는 줄을 의미할 수 있으며, 일반적으로 와튼 젤리(wharton's Jelly)로 둘러싸인 3개의 혈관, 즉 2개의 배꼽 동맥과 1개의 배꼽 정맥으로 구성된 조직을 의미할 수 있다.

- [63] 본 발명의 섬모발생용 조성물의 유효성분은 중간엽 줄기세포, 중간엽 줄기세포의 배양액 또는 이의 농축액, 유효성분의 추출물이며, 제한되지 않는다.
- [64] 본 발명에서의 용어, '배지(culture media)'는 체외배양 조건에서 줄기세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 줄기세포의 배양에 적절한 해당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 또한, 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, aMEM(a-modified Minimum Essential Media), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 등이 있지만, 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [65] 본 발명에서는 해당 업계에서 세포배양에 사용되는 aMEM(a-modified Minimum Essential Media)를 기본으로 하고, 세포배양에 통상적으로 사용되는 혈청을 포함한다.
- [66] 혈청은 0.1 내지 20%의 우태아혈청(Fetal Bovine Serum; FBS)을 사용하는 것이 바람직하고, 항생제, 항진균제 및 오염을 야기하는 마이코플라스마의 성장을 예방하는 해당 업계에서 일반적으로 사용하는 물질을 사용하는 것이 바람직하다.
- [67] 항생제로는 페니실린-스트렙토마이신 등 통상적으로 세포배양에 사용되는 항생제 모두 이용 가능하며, 항진균제로는 알포레리신 B, 마이코플라스마 억제제로는 젠타마이신, 시프로플록사신, 아지트로마이신 등의 일반적으로 사용하는 물질을 사용하는 것이 바람직하다.
- [68] 본 발명에서는 다양한 인간 탯줄, 태반, 제대혈, 지방 조직 등의 중간엽 조직에서 각 조직에 적합한 공지의 방법으로 중간엽 줄기세포를 분리한 후, 각 중간엽 줄기세포는 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum; FBS) 및 0.5% 젠타마이신(gentamicin)(10 mg/ml)이 포함된 aMEM (a-modified Minimum Essential Media) 배지를 첨가하여 계대배양한다.
- [69] 섬모발생을 위한 중간엽 줄기세포 배양액은 4회째 계대배양한 중간엽 줄기세포(P4)를 10% 우태아 혈청 및 0.5% 젠타마이신(gentamicin)(10 mg/ml)이 포함된 aMEM 배지로 배양하였으며, 70% confluency가 되었을 때 우태아 혈청을 제외한 aMEM 배지(serum-free aMEM)로만 24시간 배양 후 얻은 배양액을 농축하거나(2X, 5X, 10X), 원농도(1X)로 사용한다.
- [70] 본 발명의 다양한 유래의 중간엽 줄기세포 배양액(5X, 10X)은 망막색소상피세포(RPE 세포)에서 양성 대조군인 SAG 및 GSK-503과 동일 또는 높은 수준으로 일차 섬모 발생을 유도하는 결과를 보였다.
- [71]

- [72] 본 발명에서는 세포의 일차섬모 발생을 위해 중간엽 줄기세포와의 공동배양법을 이용할 수 있다. 본 발명의 중간엽 줄기세포 및 섬모 발생을 유도할 목적 세포는 통상적으로 사용되는 Transwell™ Chamber System을 사용하여 공동배양한다. 구체적으로는 투과성 막을 경계로 well의 하부에는 섬모 발생을 유도할 목적 세포를, Transwell에는 중간엽 줄기세포를 배양하여, 두 종류의 세포의 직접접촉을 막은 채, 중간엽 줄기세포에서 분비된 인자를 목적세포가 수용하여 섬모를 발생하게 된다.
- [73] 본 발명의 다양한 유래의 중간엽 줄기세포와 망막색소상피세포(RPE 세포)의 공동배양에 의해서도 양성 대조군인 SAG 및 GSK-503과 동일 또는 높은 수준으로 일차 섬모 발생을 유도하는 결과를 보였다.
- [74] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액 또는 중간엽 줄기세포를 개체에 투여하여 섬모 이상으로 야기되는 질병인 섬모형성이상증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [75] 본 발명에서는 섬모형성이상증을 치료하기 위해 환자에게서 섬모형성에 이상이 있는 세포를 분리하여 중간엽 줄기세포 배양액을 처리하거나 중간엽 줄기세포와의 *Ex-vivo* 공동배양으로 섬모형성을 향상시킨 후 다시 환자에게 주입할 수 있는 세포치료제를 제공한다.
- [76] 또한, 본 발명에서는 환자에게서 섬모형성에 이상이 있는 세포를 분리하여 중간엽 줄기세포 배양액을 처리하거나 중간엽 줄기세포와의 *Ex-vivo* 공동배양으로 섬모형성을 향상시킨 후 다시 환자에게 주입하는 방법을 포함하는 섬모형성이상증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [77] 본 발명에서는 중간엽 줄기세포 배양액을 이용하여 섬모 발생 촉진을 통해 헤어의 생성 촉진, 각질의 분화 촉진, 멜라닌 생성 억제 기능을 유도하는 화장용 조성물을 제공한다.
- [78] 또한, 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양액을 포함하는 화장료 조성물을 피부에 도포 또는 처리하여 피부 미백, 및/또는 피부 각질 세포의 섬모발생을 유도하는 방법을 제공한다.
- [79] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조될 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등에서 선택된 성분을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [80] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 담체 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 결합제, 활택제, 계면활성제, 충전제, 붕해제, 점증제, 안정화제, 희석제, 보존제, 감미제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 그 외의

제제는 통상의 지식을 가진 사람의 수준 내에 있다.

- [81] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [82] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우 정맥, 피하, 근육, 복강, 경피 등에 투여할 수 있다.
- [83] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량 결정은 통상의 지식을 가진 사람의 수준 내에 있으며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 병기, 건강상태 등에 따라 달라질 수 있다. 효과적인 투여량은 체외실험 또는 동물 모델 시험에서 얻어진 용량-반응곡선으로부터 추정할 수 있다.
- [84] 본 발명의 약제학적 조성물은 심모 발현 이상과 연관된 질병을 치료하기 위한 것일 수 있다. 상기 심모 발현 이상과 연관된 질병은 사람의 유전성 심모 장애 질환(ciliopathy)인 바뎃-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrom; BBS)이나 알스트롬 증후군(Alstrom syndrome)뿐 아니라 다낭성 신장질환(polycystic kidney diseases; PKD), 신장 낭종(renal cysts), 불임(infertility), 호흡기 질환(respiratory disorder), 내장역위증(situs inversus), 암, 및 당뇨(diabetes), 비만(obesity), 고혈압(hypertension)과 같은 대사성 질환 등 다양한 형태로 나타난다.
- [85] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조될 경우, 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 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.
- [86] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [87] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 하이드록시 알루미늄, 또는 칼슘 실리케이트가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로 플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [88] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예를 들어, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [89] 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.

- [90] 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, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [91] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 중간엽 줄기세포 배양액과 담체 성분 이외에, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [92] 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 중간엽 줄기세포 또는 이의 배양액의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%, 0.01 내지 5 중량%인 것이 더욱 바람직하다. 상기 함량이 0.001 중량% 미만에서는 목적하는 헤어 생성 촉진, 미백, 또는 피부각질 형성세포 분화 촉진을 기대할 수 없고, 10 중량% 초과에서는 안전성 또는 제형상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.
- [93] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변경 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[94]

발명의 실시를 위한 형태

- [95] 실시예 1: 탯줄 조직 유래 중간엽 줄기세포의 배양액 제조
- [96] 인간 탯줄, 태반, 제대혈은 삼성의료원의 IRB(Institutional Review Board of Samsung Medical Center) 승인 후 산모의 동의를 받아 채취하였고, 지방 조직 역시 삼성의료원의 IRB 승인 후 환자의 동의를 받아 채취하였다.
- [97] 인간 태반 유래 중간엽 줄기세포(PLM)는 이전에 보고된 CHOI 등의 방법(PLoS ONE, (2017) 12(2): e0172642)에 따라 분리된 태반으로부터 분리하였고, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(UCBM)는 KIM 등의 방법(FEBS Letters, (2010) 584: 3601-3608)에 따라 분리된 제대혈로부터 분리하였고, 탯줄 유래 중간엽 줄기세포(WJM)는 PARK 등의 방법(Arch. Pharm. Res. (2016) 39: 1171-1179)에 따라 분리된 탯줄로부터 분리하였다.
- [98] 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포(AM)는 이전에 보고된 PALUMBO 등의 방법(Int. J. Mol. Sci. (2018) 19: 1987)에 따라 분리된 지방 조직으로부터

분리하였다.

- [99] 수득된 각각의 중간엽 줄기세포는 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum; FBS) 및 0.5% 젠타마이신(gentamicin)(10 mg/ml)이 포함된 aMEM(a-modified Minimum Essential Media) 배지를 첨가하여 계대배양하였다.
- [100] 일차 섬모 발생을 위한 중간엽 줄기세포 배양액은 4회째 계대배양한 중간엽 줄기세포(P4)를 10% 우태아 혈청 및 0.5% 젠타마이신(gentamicin)(10 mg/ml)이 포함된 aMEM 배지로 배양하였으며, 70% confluency가 되었을 때 우태아 혈청을 제외한 aMEM 배지(serum-free aMEM)로만 24시간 배양 후 얻은 배양액을 농축하거나, 원농도로 사용하였다.
- [101] 위 중간엽 줄기세포 배양액은 위해 Amicon Ultra 3K filter unit(MERCK)을 사용하여 2배, 5배, 또는 10배로 농축하였다
- [102]
- [103] 실시예 2: 중간엽 줄기세포 배양액(10X) 처리시 RPE 세포에서의 섬모발생
- [104] 중간엽 줄기세포 배양액의 일차 섬모 성장효과를 분석하기 위해 망막색소상피세포(human telomerase-immortalized retinal pigment epithelium cells, hTERT RPE-1 세포주, CRL-4000; RPE 세포주)를 ATCC에서 구입하여 사용하였다.
- [105] RPE 세포주는 5%(v/v) CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C의 온도 조건하에서 10%(v/v) 우태아 혈청(FBS) 및 0.5% 젠타마이신을 첨가한 aMEM 배지에서 배양하였다.
- [106] 배양한 RPE 세포주를 12 well plate에 접종(8 X 10⁴ cells/well)하여 24 시간 배양하여 안정화시킨 후에 실시예 1에서 제조한 10배 농축한 중간엽 줄기세포 배양액으로 배지를 교환하고, 24 시간 후 RPE 세포를 관찰하여 발생한 일차 섬모를 분석하였다. RPE 세포주에서 섬모발생을 위한 양성대조군 물질로 1 mM의 SAG, 10 mM의 GSK-503를 aMEM 배지에 첨가하여 사용하였고, 음성대조군은 aMEM 배지만 배양에 사용하였다.
- [107] RPE 세포주에서 발생한 일차 섬모는 배양이 끝난 후 일차 섬모는 ARL13B로, 핵은 Hoechst33342로 형광염색한 후 형광현미경 하에서 세포 및 일차 섬모의 수를 직접 카운트하고, 일차 섬모의 길이를 직접 측정함으로써 일차 섬모의 수 및 길이를 분석하였다.
- [108] 염색이 끝난 후 형광 현미경으로 관찰한 결과는 도 1A와 같고, 일차 섬모가 발생한 세포의 비율 및 발생한 섬모의 길이를 분석한 결과는 도 1B와 같다.
- [109] 도 1B의 결과로부터 RPE 세포주의 섬모발생 유도 조건하에서 지방 (Adipose Tissue; AM), 태반(Placenta; PLM), 제대혈(Umbilical cord blood; UCBM), 탯줄 (Wharton's jelly; WJM) 조직에서 분리한 중간엽 줄기세포 배양액을 10배 농축하여 처리하였을 때, 양성 대조군인 SAG 및 GSK-503과 동일 또는 높은 수준으로 일차 섬모가 발생하는 것을 확인할 수 있다 (음성대조군에 비해 3~5배, 양성대조군에 비해 약 1.2배).

- [110] 또한, 동일한 조건 하에서 섬모의 길이 역시 음성대조군 및 양성대조군에 비해 길어진 것으로 확인할 수 있다 (음성대조군에 비해 1.5~2배, 양성대조군에 비해 약 1.2배).
- [111]
- [112] **실시예 3: 농도에 따른 중간엽 줄기세포 배양액(1X, 2X, 5X) 처리시 RPE 세포에서의 섬모발생**
- [113] 실제 생성된 섬모를 직접 분석하기 위해 RPE 세포주에 섬모에서 특이적으로 발현하는 Smo(smoothened protein)-GFP 융합유전자를 발현하는 RPE/Smo-GFP 세포주를 사용하였다.
- [114] 실시예 1에서 제조된 각각의 중간엽 줄기세포(지방(AM), 태반(PLM), 제대혈(UCBM), 탯줄(WJM)) 배양액의 1X, 2X, 5X 농축액을 실시예 2와 동일한 섬모 발생 유도 조건하에서 RPE/Smo-GFP 세포주에 처리한 후 형광현미경을 이용하여 섬모 발생 및 길이를 분석하였다.
- [115] 배양이 끝난 후 형광현미경으로 관찰한 결과는 도 2A와 같고, 일차 섬모가 발생한 세포의 비율 및 발생한 섬모의 길이를 분석한 결과는 도 2B와 같다.
- [116] 도 2B의 결과로부터 중간엽 줄기세포 배양액의 농도에 비례하여 섬모의 발생 촉진 및 섬모 길이 증가 현상을 확인할 수 있었으며, 특히 배양액의 농도 5X에서 양성대조군과 동일 혹은 높은 수준으로 RPE/Smo-GFP 세포주의 섬모 발생을 촉진한 것을 확인할 수 있다(음성대조군에 비하여 1.5~2.5배, 양성대조군에 비하여 약 1.2배). 또한 섬모의 길이 역시 배양액의 농도 5X에서 길어진 것을 확인할 수 있었다(음성대조군에 비하여 1.5~2배).
- [117]
- [118] **실시예 4: 중간엽 줄기세포와의 공동배양시 RPE 세포에서의 섬모발생**
- [119] PPE 세포주 및 중간엽 줄기세포와의 공동배양은 Serum Free 상태에서 Transwell™ chamber를 사용하여, well의 하부에는 RPE 세포주를 배양하고, Transwell에는 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 이때 양성대조군의 하부에는 RPE 세포를 배양하고, Transwell에는 1mM의 SAG, 10 mM의 GSK-503을 aMEM 배지에 첨가하여 배양해주었고, 음성대조군은 하부에는 RPE 세포주를 배양하고, Transwell에는 aMEM 배지를 첨가하여 배양에 사용하였다.
- [120] 이때 음성대조군, 및 양성대조군 및 중간엽 줄기세포 공동 배양군의 하부에는 동일한 수의 RPE 세포주를 배양하였고, 동일 양의 배양 배지로 배양하였다
- [121] 공동 배양이 끝난 후, well 하부의 RPE 세포를 실시예 2와 동일한 방법으로 형광염색하여 섬모 발생 및 길이를 분석하였다.
- [122] 배양이 끝난 후 형광현미경으로 관찰한 결과는 도 3A와 같고, 일차 섬모가 발생한 세포의 비율 및 발생한 섬모의 길이를 분석한 결과는 도 3B와 같다.
- [123] 중간엽 줄기세포와의 공동배양은 양성대조군인 SAG와 GSK-503과 동일 혹은 높은 수준으로 RPE 세포주의 섬모발생을 촉진하고(음성대조군에 비하여 2~2.5배, 양성대조군에 비하여 약 1.1배), 섬모의 길이 역시 길어진 것을 확인할

수 있었다(음성대조군에 비하여 1.5~2배, 양성대조군에 비하여 1.2~1.3배).

[124]

[125] 이상에서 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.