

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 406**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 8/98</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/14</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/28</b>	(2015.01)
<b>A61Q 7/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/0775</b>	(2010.01)
<b>A61K 35/51</b>	(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2015 PCT/KR2015/002007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16006788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2015 E 15819530 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3146973**

54 Título: **Función promotora del crecimiento del cabello de células madre de tamaño pequeño y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**07.07.2014 US 201462021362 P**  
**19.09.2014 US 201462052635 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.12.2020**

73 Titular/es:

**MEDIPOST CO., LTD. (100.0%)**  
**21 Daewangpangyo-ro 644beon-gil, Bundang-gu,**  
**Seongnam-si**  
**Gyeonggi-do 13494, KR**

72 Inventor/es:

**YANG, YOON SUN;**  
**OH, WONIL;**  
**LEE, JANG YOUNG;**  
**CHOI, SOO JIN;**  
**JEON, HONG BAE;**  
**KIM, JU-YEON y**  
**LIM, HOON**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 799 406 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Función promotora del crecimiento del cabello de células madre de tamaño pequeño y uso de las mismas

**Antecedentes**1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del  
cabello, que contiene células madre de tamaño pequeño, particularmente células madre de tamaño pequeño que  
tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas como un ingrediente activo, un  
procedimiento de preparación de los mismos y un uso de los mismos. La presente invención se refiere a un uso de la  
10 composición que utiliza una función estimuladora del crecimiento del cabello de las células madre de tamaño pequeño  
que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor para aumentar considerablemente la actividad de las células madre del  
folículo piloso en una fase telógena.

2. Discusión de la técnica relacionada

15 De acuerdo con el desarrollo industrial, la contaminación ambiental, el estrés y el avance del envejecimiento, se han  
desarrollado gradualmente la alopecia o el adelgazamiento del cabello, y el interés en la calidad de vida y la apariencia  
están aumentando con la edad de bienestar.

La alopecia, que es la pérdida de cabello del cuero cabelludo, se produce debido a diversas causas, por ejemplo,  
causas internas tales como la constitución genética o la acción de la hormona masculina; estrés mental en la vida  
cotidiana; y causas externas como la acumulación de lipoperóxido en el cuero cabelludo. Se sabe que los síntomas  
de pérdida de cabello son causados por procesos muy complicados.

20 La calvicie no significa la falta de cabello al caerse, sino que gradualmente se adelgaza y se vuelve más fino y más  
suave, y de acuerdo con la progresión de la calvicie, una papila dérmica en la raíz del cabello es más pequeña. Como  
la papila dérmica es más pequeña, el cabello es más delgado, el ciclo capilar es más corto y el cabello recién crecido  
se vuelve más delgado. Cuando la calvicie progresa continuamente, el cabello es más suave, el ciclo capilar es aún  
25 más corto y el cabello crece un poco y luego se cae. Además, se sabe que la alopecia areata es causada por una  
enfermedad autoinmune, y la pérdida de cabello temporal que ocurre después de estrés físico o mental, tal como  
endocrinopatía, deficiencia nutricional, fármacos o parto también han llamado la atención.

Recientemente, la pérdida de cabello que incluye la pérdida de cabello de patrón masculino y la pérdida de cabello  
grueso femenino se está expandiendo gradualmente en una generación más joven. De acuerdo con la referencia  
emitida por el Korean Institute for Health and Welfare Policy of National Health Insurance Corporation en 2009, el  
30 número de pacientes domésticos con pérdida de cabello en 2008 aumentó en un 60 % o más, en comparación con el  
de 2001, y el número de pacientes con pérdida de cabello en niños y adolescentes han aumentado aproximadamente  
un 6,4 % durante cinco años, de 21.643 en 2006 a 23.025 en 2011.

Para mejorar tal pérdida de cabello, se encuentran disponibles comercialmente diversos tipos de soluciones para el  
crecimiento del cabello. Hoy, según la investigación de Economy21, la escala del mercado de servicios de cuidado del  
35 cabello coreano es del 80 % para cosméticos y productos sanitarios, y del 20 % para medicamentos, y entre estos, el  
número de pacientes con pérdida de cabello que llegan a un hospital es solo del 5 %. Hoy, los usuarios insatisfechos  
de productos para el cuidado del cabello son el 72.7 %. Sin embargo, solo hay dos medicamentos aprobados por la  
U.S. Food and Drug Administration (FDA), como el minoxidil y la finasterida lanzados en 1998 hace aproximadamente  
40 15 años, y, por lo tanto, varias causas de alopecia no se pueden recuperar por completo con solo dos medicamentos.  
Particularmente, Propecia<sup>®</sup> hecho de Finasteride<sup>®</sup> es una preparación contra la caída del cabello, pero no una solución  
para el crecimiento del cabello. Propecia<sup>®</sup> bloquea una 5- $\alpha$  reductasa para inhibir la producción de DHT y retrasa la  
pérdida de cabello de patrón masculino el mayor tiempo posible.

Dado que las soluciones para el crecimiento del cabello en el mercado (por ejemplo, Minoxidil<sup>®</sup> y Finasteride<sup>®</sup>) tienen  
un efecto secundario causado por la aplicación de un medicamento hormonal y son efectivas solo en una parte en la  
45 que se activa una raíz capilar, son efectivas en la prevención de la caída del cabello, pero insignificadamente eficientes  
en el crecimiento del cabello en una fase telógena durante mucho tiempo, y debe tomarse o aplicarse continuamente.  
Por lo tanto, para la alopecia o el adelgazamiento del cabello, se necesita el desarrollo de tecnología económica y  
estable. En Corea, en comparación con los países desarrollados, el desarrollo del estudio de un medicamento para la  
alopecia es técnicamente deficiente, y el estudio y desarrollo relacionados con la prevención de la caída del cabello,  
50 la estimulación del crecimiento del cabello y la regeneración del cabello son cuestiones muy urgentes. Si bien, como  
estudio relacionado con la pérdida de cabello, se ha informado sobre literatura relacionada con la regeneración del  
cabello y la raíz del cabello desde 1950, debido a la falta de reproducibilidad, la regeneración del cabello se ha  
considerado imposible durante los últimos 50 años.

Sin embargo, en 1990, se encontraron por primera vez las células madre del folículo piloso (Cell, 1990); las células  
55 madre del folículo piloso derivadas de humanos fueron aisladas por primera vez (J. Clin. Invest, 2006), y el resultado  
para la posibilidad de regenerar los folículos pilosos fue reportado (Nature, 2007) por el profesor Costarelli, de la

School of Medicine at University of Pennsylvania, y se abrió así la posibilidad de estudiar una cura fundamental de la calvicie.

5 Recientemente, se está desarrollando un procedimiento para tratar la alopecia usando un gen y un procedimiento para tratar la alopecia usando una célula madre. Como tecnología de fondo de la presente invención, en la Patente Coreana No. 10-0771171 (29 de octubre de 2007), se divulgan un procedimiento para aislar y hacer proliferar células madre del foliculo piloso, y diferenciar las células madre en células del foliculo piloso, y una composición para el tratamiento de la pérdida de cabello, y en la Publicación de Patente Coreana No. 10-2008-0097593 (6 de noviembre de 2008), se divulga un producto de terapia celular fabricado mezclando adecuadamente células madre derivadas de tejido adiposo y células de foliculo piloso. Además, en la Patente Coreana No. 10-1218101 (3 de enero de 2013), se divulga una composición para estimular el crecimiento del cabello o prevenir la caída del cabello que incluye un medio acondicionado de células madre mesenquimales fetales en líquido amniótico como ingrediente activo.

10 Sin embargo, no se ha informado una composición para estimular el crecimiento del cabello o prevenir la caída del cabello que exhiba un efecto excelente en consideración de la eficacia específica de las células madre de tamaño pequeño.

15 Por consiguiente, los inventores confirmaron que en general se recolectan varios tamaños de células cuando se cultivan células madre mesenquimales, y descubrieron que las células madre que tienen un tamaño específico de diámetro o menos exhibieron un efecto muy excelente de estimular el crecimiento del cabello al comparar la capacidad de estimulación de crecimiento del cabello causado por la activación de las células madre de foliculo piloso de acuerdo con los tamaños de las células madre mesenquimales derivadas de diversos tejidos en función de la posibilidad de efectos de acuerdo con el tamaño de una célula, y así se completó la presente invención.

**[Documentos de la técnica anterior]**

[Documentos de Patente]

1. Patente Coreana No. 10-0771171 (29 de octubre de 2007)
2. Patente coreana No. 10-1422559 (17 de julio de 2014)
- 25 3. Publicación de Patente Coreana No. 10-2013-0009117 (23 de enero de 2013)
4. Publicación de Patente Coreana N o.10-2014-0125735 (29 de octubre de 2014)
5. Publicación de Patente Coreana No. 10-2008-0097593 (6 de noviembre de 2008)
6. Patente Coreana No. 10-1218101 (3 de enero de 2013)
7. WO 2012/091321
- 30 El documento WO 2012/091321 describe un procedimiento para promover el crecimiento del cabello, que implica cultivar células madre adiposas y usar el líquido de cultivo. El tamaño de la célula no está restringido al tamaño definido en la presente solicitud.

**[Documentos no patente]**

- 35 1. BY Yoo, YK Seo, JK Park, et al., Effect of Mesenchymal Cells on Human Hair Growth and Death, Korean J. Chem. Eng., 25(2), 295 (2008).
2. VA Botchkarev, J Kishimoto, Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling, J. Invest Dermatol. Symp. Proc., 8(1), 46 (2003).
3. D Fiszer, M Kurpisz, T Siminiak, Stem cell therapy as the reinforcement of organ regeneration, Artif. Organs., 29(5),366 (2005).
- 40 4. H Oshima, A Rochat, C Kedzia, et al., Y Barrandon, Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells, Cell, 104(2), 233 (2001).
5. KS Stenn, G Cotsarelis, Bioengineering the hair follicle: fringe benefits of stem cell technology, Curr Opin.Biotechnol., 16(5), 493 (2005).
6. S Tiede, JE Klopper, E Bodo, et al., Hair follicle stem cells: Walking the maze, Eur. J. Cell Biol., 86(7), 355 (2007).
- 45 7. K Kataoka, RJ Medina, T Kageyama, et al., Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin, Am. J. Pathol., 163(4), 1227 (2003).
8. C Blanpain, WE Lowry, A Geoghegan, et al., Self-renewal, multipotency and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche, Cell, 118(5), 635 (2004).

9. MJ Hoogduijn, E Gorjup, PG Genever, Comparative characterization of hair follicle dermal stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells, Stem Cells Dev., 15(1), 49 (2006).

A lo largo de la especificación, se hace referencia a diversas tesis y patentes y se refieren citas de las mismas.

### Descripción detallada de la invención

#### 5 Problema técnico

La presente invención consiste en el uso de un tamaño de una célula madre que tiene una función estimulante del crecimiento del cabello considerablemente excelente, que estimula la actividad de las células madre del folículo piloso, y está dirigida a proporcionar una composición para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, la cual contiene células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o, un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo.

La presente invención también se dirige a proporcionar un procedimiento para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello usando la composición. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

#### Solución técnica

15 Para resolver el objetivo, la presente invención proporciona una función de células madre que tienen un diámetro de tamaño pequeño para estimular el crecimiento del cabello y diversos usos de las mismas.

Como una realización de ejemplo de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en la terapia para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, que contiene células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas como un ingrediente activo.

20 El efecto de prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello se obtiene porque las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas, tiene la función de activar las células madre del folículo piloso, y más particularmente, tiene efectos de (i) tiempo reducido para convertir una fase telógena en una fase anágena en un ciclo capilar, (ii) normalización de la regulación del ciclo capilar y (iii) un aumento en la generación de células de la papila dérmica.

25 Aquí, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor pueden ser al menos un tipo de células madre seleccionadas del grupo que consiste en células madre adultas humanas derivadas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, sangre, hígado e intestino, piel, tracto gastrointestinal, placenta, nervio, suprarrenal, epitelio y útero, y células madre embrionarias, y preferiblemente, células madre adultas derivadas de médula ósea, sangre de cordón umbilical o tejido adiposo, y más preferiblemente, células madre adultas derivadas de sangre de cordón umbilical, y lo más preferiblemente, células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical. Adicionalmente, se usa lo más preferiblemente sangre de cordón umbilical derivada de humanos.

30 Además, el medio acondicionado puede ser cualquier medio adecuado para el crecimiento de células animales como medio basal y, como ejemplo ilimitado, se puede utilizar un medio esencial mínimo (MEM), un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), un medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), o un medio libre de queratinocitos de suero (K-SFM). Preferiblemente, se usa un medio  $\alpha$ -MEM.

35 La composición puede proporcionarse preparándose en forma de una composición farmacéutica o una composición cosmética.

40 Mientras tanto, en otra realización de ejemplo de la presente invención, se proporciona un procedimiento de uso de la composición para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, que contiene células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo, mediante administración percutánea usando inyección.

En otra realización de ejemplo de la presente invención, se proporciona un uso cosmético no terapéutico de una composición para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, en el que la composición comprende células madre de tamaño pequeño o un medio acondicionado de las mismas como se define aquí.

45 También se describe en la presente memoria un procedimiento para tratar la pérdida de cabello usando células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o también se proporciona un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo.

50 En esos procedimientos, lo más preferiblemente, las células madre o su composición se administran mediante administración percutánea usando inyección. Aquí, la inyección se realiza efectivamente por la forma en que la composición se administra en la dermis de un objetivo colocando hacia arriba el agujero de la aguja de la jeringa.

Por consiguiente, la presente invención se completa basándose en el hallazgo de que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas, tiene la capacidad más

excelente para el efecto de prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello en comparación con las células heterogéneas convencionales en las que se mezclan varios tamaños de células madre, y proporciona un excelente efecto de células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello de acuerdo con la activación de las células madre del folículo piloso, y diversos usos de las mismas.

Las realizaciones ejemplares de la presente invención se describirán en detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos.

La terminología utilizada en este documento se define como sigue.

La "estimulación del crecimiento del cabello" o "prevención de la caída del cabello" tiene un significado similar e incluye otro término utilizado en la técnica, tal como la estimulación del crecimiento del cabello o la promoción del crecimiento del cabello y la prevención del debilitamiento o la pérdida del cabello.

La "célula madre" significa una célula que puede desarrollarse hasta cualquier tejido. Hay dos características básicas: la autorrenovación que la autoproduce por división repetida, y la diferenciación de multipotencia en células que tienen una función específica de acuerdo con un entorno.

La "célula madre mesenquimal" es un tipo de células madre adultas no diferenciadas aisladas de un tejido humano o de mamífero, y puede derivarse de diversos tejidos. Entre las células madre adultas, una célula madre hematopoyética generalmente no es adherente, pero la célula madre mesenquimal generalmente es adherente. Particularmente, la célula madre mesenquimal puede ser una célula madre mesenquimal derivada de cordón umbilical, una célula madre mesenquimal derivada de sangre de cordón umbilical, una célula madre mesenquimal derivada de médula ósea, una célula madre mesenquimal derivada de tejido adiposo, una madre mesenquimal derivada de músculo, una célula madre mesenquimal derivada de nervio, una célula madre mesenquimal derivada de piel, una célula madre mesenquimal derivada de amnios, o una célula madre mesenquimal derivada de placenta, y preferiblemente, una célula madre mesenquimal derivada de sangre de cordón umbilical. Ya se conoce en el arte una técnica para aislar una célula madre de cada tejido.

El "medio condicionado de células madre" es un material que contiene componentes incluidos en un medio obtenido mediante el cultivo de células madre, y se puede usar cualquier tipo de células madre para preparar el medio acondicionado sin limitación. Por ejemplo, las células madre para preparar el medio acondicionado pueden ser células madre embrionarias o células madre adultas. Además, las células madre adultas pueden derivarse de cada tejido. En una realización de ejemplo de la presente invención, se prepara un medio acondicionado usando células madre adultas derivadas de sangre de cordón umbilical.

La "diferenciación" significa un fenómeno de especialización de estructuras o funciones de las células cuando se dividen, proliferan y crecen, es decir, un cambio en la morfología o la función de las células o tejidos de un organismo para realizar sus propios trabajos. En general, es el fenómeno de dividir un sistema relativamente simple en al menos dos sistemas parciales cualitativamente diferentes.

El término "proliferación" o "crecimiento" de células se refiere a la amplificación de células homogéneas por división, es decir, un aumento en el número de células generalmente en un organismo multicelular. Cuando el número de células alcanza un cierto nivel por proliferación (amplificación), un carácter generalmente cambia (se diferencia) y se controla al mismo tiempo.

El "medio" significa una mezcla para el crecimiento y la proliferación de células fuera de un organismo que incluye factores esenciales utilizados en el crecimiento y la proliferación de células, por ejemplo, sacáridos, aminoácidos, diversos tipos de nutrientes, suero, factores de crecimiento y minerales. Particularmente, el medio de la presente invención es un medio para el crecimiento y la proliferación de células madre.

El "medio basal" es una mezcla que incluye sacáridos esenciales, aminoácidos, agua, etc., necesarios para que las células vivan, y una mezcla que excluye sustancias nutritivas y diversos tipos de factores de crecimiento. El medio basal de la presente invención puede usar un medio sintetizado artificialmente o un medio preparado comercialmente. El medio preparado comercialmente puede ser, entre otros, por ejemplo, un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), un medio de diferenciación endotelial (EDM), un medio esencial mínimo (MEM), un medio basal Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, un medio esencial  $\alpha$ -mínimo ( $\alpha$ -MEM), un medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM) o un medio de Dulbecco modificado Iscove.

El "tratamiento" significa una metodología para obtener un resultado clínico beneficioso o de ejemplo. Para el objeto de la presente invención, el resultado beneficioso o de ejemplo incluye ilimitadamente la paliación de los síntomas, la reducción del rango de una enfermedad, la estabilización de una enfermedad (es decir, no deteriorada), el retraso de la progresión de una enfermedad o la reducción de la tasa de progresión de una enfermedad, mejora o paliación temporal y reducción de una condición de enfermedad (parcial o totalmente), detectable o no detectada. El "tratamiento" denota todos los tratamientos terapéuticos y los procedimientos preventivos o de precaución. Los tratamientos incluyen tratamientos necesarios para la prevención de la discapacidad y la discapacidad ya existente. La "paliación/paliativo" de una enfermedad significa que un rango de la condición de la enfermedad y/o síntomas

clínicos no de ejemplo se reducen y/o un curso de tiempo de progresión de la enfermedad se retrasa o se extiende.

La "cantidad efectiva" es una cantidad adecuada que afecta a un resultado clínico o bioquímico beneficioso o de ejemplo. La cantidad efectiva puede administrarse una vez o más. La cantidad efectiva es una cantidad adecuada para paliar, mejorar, estabilizar, restaurar o retrasar temporalmente la progresión de una enfermedad. En la presente invención, la cantidad efectiva es una cantidad adecuada para reducir o retrasar la progresión de la caída del cabello o estimular el crecimiento del cabello. Si animales dados soportan la administración de la composición, o la composición es apropiada para administrarse a los animales, significa que la composición está "disponible farmacéutica o fisiológicamente". Cuando la cantidad de la composición por administrar es fisiológicamente importante, se puede decir que una preparación se administra en una "cantidad terapéuticamente efectiva". Cuando la existencia de la preparación produce un cambio fisiológicamente detectable en un paciente dado, la preparación es fisiológicamente significativa.

El término "aproximadamente" indica una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud cambiados en 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 %.

A lo largo de la especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, debe entenderse que "incluye" y/o "incluir" y "comprende" y/o "comprender" especifican la presencia de pasos o elementos, o grupos de los mismos, pero no precluye la presencia o adición de uno o más pasos o elementos, o grupos de los mismos.

En lo que sigue, se describirá la presente invención en detalle.

### [Células madre]

La presente invención se refiere a un uso de células madre que tienen un diámetro de tamaño pequeño para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello.

Las células madre son células que tienen una capacidad de autorrenovación y una capacidad de diferenciarse en al menos dos células. Dependiendo de los orígenes de la fuente, se pueden usar células madre embrionarias o células madre adultas, y en la presente invención, se puede utilizar preferiblemente, células madre adultas derivadas de diversos tejidos originados de diversas fuentes, por ejemplo, células madre derivadas de un tejido tal como adiposo, útero, médula ósea, músculo, placenta, sangre de cordón umbilical o epidermis. Más particularmente, las células madre son células madre mesenquimales (MSC). Las células madre mesenquimales generalmente son estromas que ayudan a la hematogénesis, y tienen la capacidad de diferenciarse en varias células mesodérmicas, incluidas las células óseas, cartilaginosas, adiposas y musculares, y proliferan fácilmente a la vez que mantienen un estado indiferenciado. En una realización de ejemplo de la presente invención, se usan células madre mesenquimales (MSC) adiposas, de médula ósea y de cordón umbilical.

Más preferiblemente, se usan células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical.

La sangre de cordón umbilical es sangre generada a partir de cordón umbilical después del nacimiento, que contiene grandes cantidades de células madre hematopoyéticas y células progenitoras endoteliales que forman glóbulos blancos y glóbulos rojos y plaquetas, y también contiene células madre mesenquimales que forman cartílagos y huesos, músculos y nervios, y por lo tanto es muy valiosa en el campo médico. La sangre de cordón umbilical tiene una mayor concentración de células madre hematopoyéticas que las de la médula ósea o la sangre periférica, y está menos madura. En consecuencia, en comparación con las células madre hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea, las células madre hematopoyéticas en la sangre de cordón umbilical exhiben una capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación más excelente. Además, la sangre de cordón umbilical se puede obtener de cordón umbilical descartado mediante procedimientos médicos simples, y dado que el cordón umbilical incluye muchas más células madre hematopoyéticas y células madre que la cantidad dada, en un aspecto de la presente invención, se utilizan las células madre mesenquimales aisladas de sangre de cordón umbilical humano.

En particular, las células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical (i) pueden evitar principalmente el inmunorrechazo a diferencia de otras células madre derivadas de tejido, cuando se usan para un producto de terapia celular, (ii) pueden tomarse de la placenta y el cordón umbilical que generalmente se descartan y, por lo tanto, un donante no sufre ningún dolor cuando se producen las células madre, y (iii) cuando se aplica, se pueden administrar directamente a una lesión. Aquí, cuando las células madre se trasplantan realmente a una lesión correspondiente, se activa un efecto paracrino, se secretan factores de secretoma (proteínas, citoquinas) capaces de tratar, regenerar o restaurar una lesión, y así se cura la lesión. Mientras tanto, las células madre de acuerdo con la presente invención pueden proliferar y cultivarse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Un medio adecuado puede ser cualquiera desarrollado para cultivar células animales, particularmente células de mamífero, o cualquiera que pueda prepararse *in vitro* con componentes adecuados requeridos para el crecimiento de células animales, por ejemplo, carbono, nitrógeno y/o nutrientes traza asimilables.

El medio puede ser cualquier medio basal adecuado para el crecimiento de células animales, y como ejemplo ilimitado, un medio esencial mínimo (MEM), un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), un medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), o un medio libre de suero de queratinocitos (K-SFM) puede usarse generalmente como

medio basal usado para cultivar células. Aparte de esto, cualquier medio usado en la técnica puede usarse sin limitación. Preferiblemente, el medio puede seleccionarse del grupo que consiste en un medio  $\alpha$ -MEM (GIBCO), un medio K-SFM, un medio DMEM (Welgene), un medio MCDB 131 (Welgene), un medio IMEM (GIBCO), un medio DMEM/F12, un medio PCM, un M199/F12 (mezcla) (GIBCO) y un medio de expansión MSC (Chemicon).

5 Las fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y oligoelementos, y como ejemplo ilimitado, una fuente de suero, un factor de crecimiento, un aminoácido, un antibiótico, una vitamina, una reductasa y/o una fuente de sacárido pueden agregarse a dicho medio basal. Sin embargo, es evidente que los medios más adecuados para diversas células madre derivadas de tejido pueden seleccionarse o combinarse, y las células madre pueden cultivarse adecuadamente por los expertos en la técnica. En una realización de ejemplo, se usa un medio  $\alpha$ -MEM o un medio K-SFM.

10 También es evidente que las células madre se pueden cultivar mediante la regulación de condiciones tales como entornos de cultivo, tiempo y temperatura adecuados con base en el conocimiento convencional en la técnica por los expertos en la técnica.

15 En una realización de ejemplo, las células madre mesenquimales se cultivaron y se hicieron proliferar para tener una confluencia celular de aproximadamente 80 a 90 %, preferiblemente, aproximadamente 90 %, en un medio  $\alpha$ -MEM, lavado con, por ejemplo, PBS, y luego se cultivaron adicionalmente en un medio K-SFM durante aproximadamente 20 a 25 horas, preferiblemente 24 horas.

20 El término "confluencia ( %)" se usa convencionalmente en la técnica para expresar una densidad celular (grado de saturación) por área, y es una unidad utilizada habitualmente en experimentos por los expertos en la técnica para expresar relativamente el número de células (densidad celular) por unidad de área en cultivo celular. La presente invención también incluye un procedimiento para preparar las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu$ m o menor y un medio acondicionado de las mismas.

25 Mientras tanto, el procedimiento puede incluir además una operación de tratamiento de células madre cultivadas en un medio de acuerdo con la presente invención con tripsina. Cuando las células madre cultivadas se tratan con tripsina, se pueden obtener células madre del tipo de células individuales, y aquí, la tripsina se trata para inhibir la agregación entre células y tener células madre de tipo de células individuales. La tripsina puede reemplazarse con un material capaz de inhibir la formación de la agregación entre las células.

El cultivo de células madre puede realizarse en un recipiente convencionalmente conocido. Por ejemplo, las células madre pueden cultivarse usando un biorreactor tridimensional o un rotador, o en un recipiente adhesivo general.

**[Función de estimulación del crecimiento del cabello]**

30 La presente invención se refiere al uso de la función particularmente excelente de las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 10  $\mu$ m o menor, lo más preferiblemente, 8  $\mu$ m o menor, para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello.

35 La función de las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu$ m o menor para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello es causada por la normalización de un ciclo capilar y aumenta el número y el grosor de los folículos pilosos al estimular la actividad de las células madre del folículo piloso para reducir el tiempo de conversión de una fase telógena en una fase anágena en el ciclo capilar y aumentar la generación de células de la papila dérmica.

40 El cabello humano pasa por un proceso en el que se repite un ciclo de una fase anágena, una fase catágena y una fase telógena, y se lleva a cabo la caída y la regeneración del cabello, y el ciclo capilar se opera regulando las hormonas o diversos factores de crecimiento. El cabello está insertado en la piel y cubierto con epidermis y dermis, lo que se denomina folículo piloso. Hay una papila dérmica, que es un tejido que controla el cabello, en el folículo piloso, y las células madre del cabello que forman el cabello justo en la papila dérmica para producir cabello nuevo y empujar el cabello hacia arriba a la vez que se dividen. Las células de la papila dérmica tienen un ciclo que consiste en una fase anágena en la que el crecimiento de las células está activo, una fase catágena en la que comienza la degeneración y una fase telógena. Cuando se reciben señales de células adyacentes después de la fase telógena, las células vuelven a entrar en la fase anágena, y se realiza la renovación de las células, y por lo tanto se produce nuevo cabello.

45 El folículo piloso es un órgano de la piel solo en mamíferos, y se genera a partir de una fase prenatal por interacción entre la epidermis y el mesénquima.

50 La generación de folículo piloso en la fase prenatal comienza en respuesta a una señal de la dermis, y así la epidermis se vuelve gruesa y se conforma en una placa. Una señal de la epidermis generada a partir de la placa epidérmica gruesa induce la agregación de células dérmicas derivadas del mesénquima, y se genera nuevamente una señal de la dermis desde el agregado formado. Esta señal estimula la proliferación de las células epidérmicas e induce la penetración de las células epidérmicas en la dermis para rodear el agregado, y así se forma una papila dérmica. En consecuencia, se forma la primera estructura del folículo piloso, y luego se produce la proliferación y diferenciación de las células epidérmicas y conducen al desarrollo de un folículo piloso maduro que produce cabello. En el folículo piloso

maduro, se produce una diferenciación especializada de las células de la matriz capilar mediante la interacción entre las células de la matriz capilar y las células de la papila dérmica a través de una membrana basal del folículo piloso, y así se produce y crece el cabello. Además, la interacción conduce al ciclo del folículo piloso, mantiene un órgano y determina características biológicas como el grosor y la morfología del cabello.

- 5 Dos factores importantes que regulan las características biológicas en el folículo piloso son una célula de la vaina de la raíz externa (SRO), que es la epidermis del folículo piloso, y una papila dérmica (DP) derivada del mesénquima, y el cabello crece y se cae mediante la repetición del ciclo capilar.

10 Un estrato córneo y el cabello se producen y caen mediante la proliferación y diferenciación de una superficie de la piel y un folículo piloso, respectivamente, y una fuente celular básica que los complementa, mantiene y regenera continuamente son las células madre. Se sabe que el folículo piloso tiene un contenedor de células madre epidérmicas en una parte hinchada, que participa en el mantenimiento del folículo piloso y la renovación de las glándulas sebáceas y la epidermis del tallo piloso. Además, hay células que amplifican el tránsito derivadas del mesénquima en una vaina dérmica (DS) debajo del folículo piloso para mantener una papila dérmica del folículo piloso en la fase anágena, y las células que amplifican el tránsito derivadas del mesénquima se conocen como fuente celular que es capaz de reemplazar un componente de la dermis de una piel biosintética, es decir, fibroblastos, y convertirse en un objeto de estudio. Por lo tanto, se puede ver que la pérdida de cabello puede tratarse eficazmente mediante el procedimiento de activación de las células madre del folículo piloso en la fase telógena de la presente invención.

15 En particular, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor de la presente invención reducen considerablemente el tiempo para convertir la fase telógena en la fase anágena en el ciclo capilar. Es decir, la regulación del ciclo capilar se normaliza al estimular la activación de las células madre del folículo piloso en la fase telógena.

20 A continuación, se describirán las características de la función de las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor de la presente invención para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello.

25 (i) Las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor de la presente invención activan las células madre involucradas en la generación de células de la papila dérmica y las células madre involucradas en la extensión de la longitud del cabello. Se ha informado que las fuentes convencionales que permiten el crecimiento del cabello afectan solo una parte de diversos factores necesarios para inducir el crecimiento del cabello. Por ejemplo, en los documentos anteriores conocidos, la activación de las células madre del folículo piloso involucradas en el crecimiento del cabello es la activación de las células madre involucradas en la producción de papila dérmica (DP) o células madre involucradas en la extensión del largo del cabello.

30 Por el contrario, según la presente invención, como la mayoría de las células madre del folículo piloso relacionadas con el cabello se activan además de los dos tipos de células madre, el número y el grosor de los folículos pilosos aumentan, y el grosor del tejido también aumenta. Es decir, la presente invención proporciona una fuente que afecta varios factores al mismo tiempo, y se usa para el tratamiento combinado para la pérdida de cabello y la estimulación del crecimiento del cabello.

35 (ii) Las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor de la presente invención reducen en gran medida el tiempo para convertir la fase telógena en la fase anágena en el ciclo capilar.

40 Por lo tanto, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor de la presente invención exhiben un efecto permanente de crecimiento del cabello al normalizar la regulación del ciclo capilar, no un efecto temporal sobre las hormonas.

45 Los fármacos convencionales que incluyen Minoxidil<sup>®</sup> retrasan la progresión de la caída del cabello o ayudan en el mantenimiento del cabello actual en la fase anágena sin tratamiento permanente y, por lo tanto, cuando se detiene el uso de los fármacos, se produce la caída del cabello de inmediato.

Sin embargo, las células madre de tamaño pequeño de la presente invención son capaces de tratar fundamentalmente la pérdida de cabello basándose en un efecto de crecimiento permanente del cabello ya que el número y el grosor de los folículos pilosos aumentan y la producción de papila dérmica (DP) aumenta a través de la normalización del ciclo capilar.

50 En una realización de ejemplo de la presente invención, se confirma que las células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical de tamaño pequeño tienen el tiempo más corto para convertirse en la fase anágena. Además, en comparación con Minoxidil<sup>®</sup> y PRP, que es ampliamente conocido como un medicamento para el crecimiento del cabello, las células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical de tamaño pequeño aumentan considerablemente la cantidad y el grosor de los folículos pilosos, es decir, muestran el mayor efecto sobre crecimiento del cabello.

55 Además, se confirma que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor de la

presente invención o un medio acondicionado de las mismas exhibe un alto efecto de estimular el crecimiento del cabello mediante la activación de las células madre del folículo piloso, en comparación con células madre heterogéneas convencionales en las que se mezclan diversos tamaños de células madre.

5 Como se conoce convencionalmente, cuando se cultivan células madre mesenquimales, se mezclan las células madre que tienen diversas distribuciones de tamaño. Sin embargo, en la presente invención, cuando solo las células de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor de la presente invención se extraen al cultivo, se exhibe considerablemente el efecto de estimular el crecimiento del cabello.

10 Es decir, para el efecto de prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, el "tamaño" de las células madre es un factor muy importante, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor tienen un excelente efecto de reducción de melanina, independientemente de un tipo de tejido como el adiposo, la médula ósea o la sangre de cordón umbilical del que se derivan las células madre, y particularmente, las células madre derivadas de la sangre de cordón umbilical de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor tienen el efecto más excelente.

[Composición y uso de las mismas]

15 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición para su uso en la terapia de pérdida de cabello para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello, que comprende células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor, o un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo, un procedimiento para su uso a través de la administración percutánea usando inyección, y un uso cosmético no terapéutico de una composición cosmética para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello,  
20 en la que la composición comprende células madre de tamaño pequeño o un medio acondicionado de las mismas como se define aquí.

Las células madre pueden estar contenidas en una concentración efectiva en un rango que no exhibe citotoxicidad de 10 a 30 % (v/v), preferiblemente, 15 a 25 % (v/v), y lo más preferiblemente 20 % (v/v), pero la presente invención no está limitada a los mismos.

25 Como una realización de ejemplo de la presente invención, la composición para su uso de la presente invención incluye una composición farmacéutica. Como realización de ejemplo adicional, la presente invención incluye un uso cosmético no terapéutico de una composición cosmética para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, en el que la composición comprende células madre de tamaño pequeño o un medio acondicionado como se define aquí.

### 30 **Composición farmacéutica**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en la terapia de pérdida de cabello para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello, que contiene células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor, o un medio acondicionado de las mismas como un ingrediente activo.

35 La pérdida de cabello o alopecia se clasifica en gran medida en alopecia cicatricial y alopecia no cicatricial, y la alopecia no cicatricial incluye alopecia congénita, alopecia de patrón masculino y alopecia areata, y en la presente invención, todos los tipos están incluidos, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

40 Un vehículo farmacéuticamente disponible incluido en la composición farmacéutica de la presente invención es uno utilizado convencionalmente en la preparación, que incluye, entre otros, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma de acacia, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un emulsionante, una suspensión o un conservante además de los componentes descritos anteriormente.

45 Una dosis adecuada de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención varía debido a causas tales como el procedimiento de preparación, el procedimiento de administración, edad del paciente, peso corporal, sexo, gravedad de una enfermedad, dieta, tiempo de administración, ruta de administración, velocidad de excreción y sensibilidad a la reacción, y un médico capacitado normalmente puede determinar fácilmente una dosis efectiva en el tratamiento deseado y prescribir la dosis efectiva de composición farmacéutica. Mientras tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser, pero no se limita a, 0,01 a 2000 mg/kg (peso corporal) por día.

50 La composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede administrarse por vía oral o parenteral, y cuando se administra por vía parenteral, la composición farmacéutica puede administrarse por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección muscular, inyección abdominal o administración percutánea, y preferiblemente administración parental. La ruta de administración de la composición farmacéutica para su uso según la presente  
55 invención se puede determinar de acuerdo con un tipo de enfermedad a la que se aplica la composición farmacéutica.

Por ejemplo, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención se administra más preferiblemente mediante aplicación local sobre la piel. Una región a la que se puede aplicar la composición para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier región del cuerpo que requiera el crecimiento del cabello, además de un cuero cabelludo. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede usarse en una región en la que el cabello está dañado debido a una cicatriz causada por una lesión, o una frente ancha o frente en forma de M, pestañas o una ceja para un efecto cosmético simple y para mejorar la condición de atricosis.

Más preferiblemente, la composición para su uso de acuerdo con la presente invención se administra por administración percutánea a través de inyección.

En este caso, para hacer fluir la composición a través de un capilar después de una difusión suficiente en la dermis en la piel, es decir, para evitar que pase brevemente la dermis sin suficiente difusión y fluya al cuerpo inmediatamente, la composición puede inyectarse mientras se coloca hacia arriba el agujero de la aguja de la jeringa hacia arriba.

### Composición cosmética

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un uso cosmético no terapéutico de una composición cosmética para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, que contiene células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionador del mismo como ingrediente activo.

La composición cosmética que se usa en la presente invención puede prepararse en cualquier forma de producto preparada convencionalmente en la técnica, por ejemplo, una emulsión, una crema, una loción facial, un paquete, una base, una loción, un fluido, o un cosmético para el cabello, pero la presente invención no se limita a los mismos.

La composición puede prepararse en un tipo de champú, un enjuague para el cabello, un tónico para el cabello, un gel para el cabello, una loción para el cabello, un paquete para el cabello, un spray para el cabello, una espuma para el cabello, un tratamiento para el cabello, un color para el cabello, un acondicionador para el cabello, una mezcla de los mismos, por ejemplo, una mezcla de champú y enjuague, una mezcla de enjuague y tratamiento, o una solución líquida para el crecimiento del cabello para estimular el crecimiento del cabello mediante la adición de un aditivo convencional, y también se puede incluir una composición de tipo aerosol.

Cuando la forma del producto de la composición cosmética que se usa en la presente invención es una pasta, una crema o un gel, como componente vehículo, se puede usar aceite animal, aceite vegetal, cera, parafina, almidón, tragacanto, un derivado de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco u óxido de zinc. Cuando la forma de la composición cosmética que se usa en la presente invención es un polvo o una pulverización, como componente vehículo, se puede usar lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o poliamida en polvo, y particularmente, cuando la forma de la composición cosmética que se usa en la presente invención es un aerosol, se puede incluir adicionalmente un propulsor tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetil éter. Cuando la forma de la composición cosmética que se usa en la presente invención es una solución o una emulsión, como un componente vehículo se puede usar un disolvente, un solubilizante o un emulsionante, por ejemplo, agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, éster alifático de glicerol, polietilenglicol o éster de ácido graso de sorbitán. Cuando la forma de la composición cosmética que se usa en la presente invención es una suspensión, como componente vehículo, se puede usar un diluyente en fase líquida tal como agua, etanol o propilenglicol, una suspensión tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilensorbitol o éster de polioxietilensorbitán, celulosa microcristalina, hidróxido de aluminio, bentonita, agar o tragacanto. Cuando la forma de la composición cosmética que se usa en la presente invención es un limpiador que contiene un tensioactivo, se puede usar como un componente vehículo, sulfato de alcohol alifático, sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotionato, un derivado de imidazolio, metiltaurato, sarcosinato, éster sulfato de amida de ácido graso, alquilamidobetaína, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, un derivado de lanolina o un éster de ácido graso de glicerol etoxilado.

Un componente incluido en la composición cosmética que se usa en la presente invención puede incluir componentes usados convencionalmente en la composición cosmética, por ejemplo, adyuvantes convencionales que incluyen un antioxidante, un estabilizador, un solubilizante, una vitamina, un pigmento y una fragancia y un vehículo, además del ingrediente activo.

La composición cosmética se puede preparar por cualquier procedimiento convencionalmente utilizado.

La composición cosmética para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello puede usarse por administración percutánea tal como aplicación directa o inyección en el cuero cabelludo o el cabello.

Una cantidad aplicada de un extracto mixto que es un ingrediente activo incluido en la composición de la presente invención puede ser de 40 mg/kg o menos, y preferiblemente, de 20 a 40 mg/kg con base en un adulto.

Se pueden usar todos los procedimientos conocidos en la técnica para aplicar la composición a la piel. La composición cosmética que se usa en la presente invención puede usarse por aplicación única o repetida, o aplicación sola o en combinación con otra composición cosmética. Además, la composición cosmética que tiene un excelente efecto

protector de la piel que se usa en la presente invención puede usarse de acuerdo con un procedimiento convencional, y el número de usos puede cambiarse de acuerdo con la condición de la piel o el gusto de un usuario.

Además, desde un punto de vista diferente, se divulga en el presente documento un procedimiento para tratar una pérdida de cabello usando células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo también.

En el procedimiento anterior, las células madre utilizadas o la composición de las mismas son las mismas que se describieron previamente.

En el procedimiento de tratamiento de pérdida de cabello, en particular, las células madre o su composición se administran preferiblemente mediante administración percutánea usando inyección. Aquí, para hacer fluir la composición a través de un capilar después de una difusión suficiente en la dermis en la piel, es decir, para evitar que pase brevemente la dermis sin suficiente difusión y fluya al cuerpo de inmediato, la composición puede inyectarse mientras se coloca hacia arriba el agujero de la aguja de la jeringa.

Como se describió anteriormente, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas se describieron con base en la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención y la composición cosmética que se usa en la presente invención, pero es evidente para los expertos en la técnica que la presente invención incluye diversos tipos de composiciones y procedimientos para su uso las composiciones que tienen un efecto de prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, incluyendo células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo.

Esto es, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas, que están presentes en la composición para su uso de acuerdo con la presente invención, o que se usan en la presente invención, estimulan la activación de las células madre del folículo piloso para acortar el tiempo para convertir una fase telógena en una fase anágena en un ciclo capilar y aumenta la generación de células de la papila dérmica, y por lo tanto tienen un efecto muy excelente en prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, y la presente invención también incluye diversos usos basados en tales efectos.

#### Efectos ventajosos

De acuerdo con la presente invención, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o un medio acondicionado de las mismas estimula la actividad de las células madre del folículo piloso para reducir el tiempo de conversión de una fase telógena en una fase anágena en un ciclo capilar y aumentar la generación de células de la papila dérmica, exhibiendo así un excelente efecto de prevención de pérdida de cabello y estimulante del crecimiento del cabello, y por lo tanto es muy útil en un campo aplicable.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Los objetivos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención serán más evidentes para los expertos en la materia al describir en detalle realizaciones ejemplares de las mismas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es un diagrama esquemático que ilustra un procedimiento de fabricación de un fragmento para observar efectivamente la longitud o el número de folículos pilosos cuando se toma un tejido de ratón para observar los folículos pilosos;

La Figura 2 es una imagen que muestra los efectos del crecimiento del cabello de un grupo de control y hUCB-MS de ratones C3H, que se observan a simple vista;

La Figura 3 es una imagen de microscopio que muestra la comparación del número y la longitud de los folículos pilosos, y el grosor de la piel en el control y los grupos hUCB-MS de los tejidos de la piel de los ratones C3H;

La Figura 4 es una imagen de comparación de los efectos del crecimiento del cabello en un ratón C3H de células de tamaño pequeño aisladas de un control, y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, médula ósea y sangre de cordón umbilical, que se observan a simple vista en la 5<sup>a</sup> o 7<sup>a</sup> semana;

La Figura 5 es una imagen que muestra una combinación de resultados del análisis histológico en animales para los efectos del crecimiento del cabello (en la 7<sup>a</sup> semana) en el ratón C3H de células de tamaño pequeño aisladas de un control y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, médula ósea y sangre de cordón umbilical;

La Figura 6 es una imagen que muestra una combinación de resultados del análisis histológico en animales para los efectos del crecimiento del cabello (en la 8<sup>a</sup> semana) en el ratón C3H de un medio acondicionado de células de tamaño pequeño aisladas de un control, y células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, médula ósea y sangre de cordón umbilical;

La Figura 7 es un gráfico que muestra un resultado del experimento Cck-8 para confirmar un efecto de hUCB-MS

de tamaño pequeño sobre la proliferación de células HaCaT de acuerdo con el tiempo; y

La Figura 8 es una imagen que muestra el efecto de la proliferación de células de papila dérmica (DP) en un control, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, médula ósea y sangre de cordón umbilical mediante tinción de vivas/muertas.

## 5 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Los ejemplos se proporcionan simplemente para explicar la presente invención, y es evidente para los expertos en la materia que no se interpretará que el alcance de la presente invención se limita a los ejemplos.

10 Los inventores aislaron diversos tamaños de células madre derivadas de diversos tejidos para observar un efecto sobre el crecimiento de las células del cabello y confirmar un efecto estimulante del crecimiento del cabello. Se basa en los hechos de que las células madre de tamaño pequeño retrasan la senescencia de las células; y cuanto más vieja se vuelve la célula, mayor es el tamaño de la célula y menor es la tasa de proliferación.

## **Materiales y procedimientos**

### 1. Preparación de células madre.

#### 15 (1) Aislamiento de células madre

En la presente invención, se usaron células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical humano proporcionadas por Medipost Co., Ltd. (Corea). Las células se pueden obtener tomando sangre de cordón umbilical y aislando células madre mesenquimales de la sangre de cordón umbilical y cultivando las células madre, y las descripciones detalladas de las operaciones son las siguientes:

20 En la operación de extracción de sangre de cordón umbilical, en el parto vaginal normal, la sangre de cordón umbilical se extrae de una vena umbilical extraída mientras la placenta aún permanece en el útero después del nacimiento, o en la cesárea, se extrae sangre de cordón umbilical tomado de una vena umbilical mientras que la placenta también se extrae del útero después del nacimiento.

25 En la presente invención, cuando la sangre de cordón umbilical se extrae de la vena umbilical extraída del útero después del nacimiento, se puede tomar de la vena umbilical que une la placenta al feto mediante manipulación aséptica después del nacimiento. Primero, se obtiene la vena umbilical, y luego la sangre de cordón umbilical se coloca en una bolsa de sangre de cordón umbilical que contiene un anticoagulante usando una aguja colectora.

30 Los procedimientos para aislar y cultivar células madre mesenquimales de la sangre de cordón umbilical tomada pueden ser cualesquiera de los procedimientos utilizados convencionalmente, incluido el procedimiento descrito en la Patente Coreana No. 10-0494265 (Pittinger MF, Mackay AM, et al., Science, 284: 143-7, 1999; Lazarus HM, Haynesworth SE, et al., Bone Marrow Transplant, 16: 557-64, 1995).

35 Los monocitos se aislaron de la sangre de cordón umbilical obtenida mediante centrifugación, se lavaron varias veces para eliminar residuos, se sembraron en un recipiente de cultivo a una densidad adecuada y se cultivaron. Después de que las células se hicieron proliferar en una sola capa, se identificaron células homogéneas en forma de huso que proliferaron en forma de colonia como células madre mesenquimales utilizando un microscopio de fase. Además, cuando las células crecieron para ser confluentes, las células se hicieron proliferar para alcanzar el número de células según sea necesario a través del subcultivo.

Mientras tanto, diversas células utilizadas como control fueron células HEK293, adipocitos (ATCC, Estados Unidos), médula ósea (LONZA, Estados Unidos), HDPC y HaCat (administrado por la Chung Ang University).

#### 40 (2) Preparación de medios acondicionados

Los medios acondicionados se prepararon a partir de hUCB-MSC, BM-MSC y Adipose-MSC. Las células en un estado de almacenamiento (almacenado en un tanque LN2) se descongelaron y cultivaron en una incubadora que contenía 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C, y proliferaron en un medio  $\alpha$ -MEM (GIBCO) para tener una confluencia celular de aproximadamente el 90 %.

45 Después, las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se incubaron en un medio libre de suero de queratinocitos (K-SFM) al que no se añadió rojo fenol durante 24 horas para obtener un medio acondicionado, y el procedimiento descrito anteriormente se repitió durante 3 días. Además, el medio acondicionado obtenido se filtró (Top Filter System, Nunc), y luego se almacenó en un refrigerador y se congeló.

### 2. Cocultivo

50 hUCB-MSC (5000, 10.000, 15.000, 20.000 células/cámara superior) se cocultivó en una cámara superior (tamaño de poro: 1  $\mu$ m) junto con células relacionadas con el cabello, DP y HaCat en una cámara transpoco (Falcon, Estados

Unidos).

3. Aislamiento de células de tamaño pequeño.

5 Las células en el estado de almacenamiento (almacenadas en el tanque LN2) se descongelaron y cultivaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C, y se aislaron y obtuvieron células madre de tamaño pequeño usando filtros de membrana de 8 y 20 µm.

Aquí, se obtuvieron células que tenían un diámetro de 8 a 20 µm usando un filtro de membrana de 20 µm, y luego usando un filtro de membrana de 8 µm.

10 Además, las células madre se probaron dividiéndolas en tres grupos que incluyen un grupo 1 de células madre hetero en las que se mezclaron varios tamaños de células madre antes del aislamiento, un grupo 2 de células madre con un diámetro de 8 µm o menor, y un grupo 3 de células madre que tenían un diámetro de 20 µm o más.

4. Preparación del ratón C3H para observar el crecimiento del cabello.

Como lugares para un experimento, se utilizaron Medipost Co., Ltd (número de aprobación IRB: 131021-1) y el Gyeonggi Biocenter (proyecto IACUC no: IACUC2014-4-10), y se adquirió un ratón C3H de Saeronbio Inc., y se preparó en el Jackson Lab.

15 Particularmente, el ratón C3H (Jackson Lab, Japón) utilizado en los experimentos de la presente invención es un modelo de ratón utilizado como modelo de efectividad del crecimiento del cabello en el que se inicia una fase telógena cuando se elimina el cabello, y a diferencia de otros tipos, lleva mucho tiempo convertirse en una fase anágena. Es decir, a diferencia de otros tipos de ratones, el ratón C3H es un excelente modelo animal para confirmar un efecto de crecimiento del cabello sin el tratamiento de un fármaco inductor de la fase telógena, debido a un período muy largo de la fase telógena (Journal of Investigative Dermatology (2005) 124, 288-289).

20 Una superficie de la piel del ratón C3H se vuelve negra en una fase anágena en la que crece el cabello, y se vuelve rosa en una fase catágena, y por lo tanto el tiempo de crecimiento del cabello puede detectarse observando el color de la piel del ratón.

25 Los inventores obtuvieron ratones CH3 de 7 semanas de edad, y los ratones se adaptaron a un entorno mediante aclimatación de una semana. Además, los inventores tenían la intención de observar el tiempo para pasar de la fase telógena a la fase anágena del ciclo capilar mediante la inyección de células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical en el modelo de ratón. En este ejemplo, el modelo de ratón en el que se inyectó PBS se usó como control negativo.

30 Mientras tanto, para el afeitado, el ratón fue anestesiado. Se prepararon 15,83 ml de una solución como anestésico mezclando 3,36 ml de Rompun (Bayer Corea, 2094L, Corea) en 5 ml de zoletil (código de barras #3UHC, Corea) y añadiendo 7,47 ml de solución salina (JW Pharmaceutical, REG # 10055, Corea), y el ratón se anestesió con 20 µl de la solución.

35 Además, después de la anestesia, se afeitó el ratón usando un cortacabellos. El ratón se colocó sobre un papel limpio y el cabello se afeitó primero en una dirección opuesta a la dirección del crecimiento del cabello. Después el ratón se mantuvo durante 24 horas, y luego se revisó de nuevo para eliminar el cabello restante.

5. Inyección de células madre de la presente invención.

40 Para evitar el flujo directo de las células madre de la presente invención hacia el cuerpo del ratón a través de la dermis en la piel, se colocó hacia arriba el agujero de la aguja de la jeringa y se introdujo en la dermis del ratón anestesiado para evitar pasara rápidamente por la dermis sin suficiente difusión y fluyera al cuerpo de inmediato. Aquí, cuando se inyectaron las células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical, se agarró fuertemente la piel para que no se fugaran las células madre al exterior, y las células madre se inyectaron completamente frotando la piel para sacar la aguja de la piel.

6. Toma de tejidos del ratón.

45 Para comprobar el efecto de acuerdo con la presente invención, se tomaron tejidos de la piel del ratón en el que se inyectaron las células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical.

50 Se preparó una placa de 6 pozos, fórceps, tijeras para cirugía, papel limpio y un removedor de cabello, y primero, se retiró el cabello previamente crecido del ratón. La piel de la espalda más cercana a la cabeza se recogió con unas pinzas, se cortó un tejido de la piel con las tijeras para cirugía, y el tejido cortado se pegó en el papel y se cortó nuevamente en forma de hexágono. Aquí, el corte se realizó con cuidado para no dañar una parte del tejido que se iba a fotografiar, y se realizó al hacer coincidir el papel con un extremo del tejido para que se adhiresen fácilmente entre sí.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una dirección de preparación de un fragmento para observar la

longitud y el grosor de los folículos pilosos (arriba) y una dirección de preparación de un fragmento para observar el número y el tamaño de los folículos pilosos (abajo). Como los tejidos se tomaron en estas direcciones, se puede observar una sección transversal longitudinal y una sección transversal numérica de los folículos pilosos.

### 7. Tinción H&E

- 5 El tejido obtenido se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se lavó con PBS durante 15 minutos para observación, y se lavó nuevamente tres veces con PBS que contenía 4 % de sacarosa durante 15 minutos. Posteriormente, el producto resultante se hizo reaccionar durante la noche con PBS que contenía 30 % de sacarosa a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, el producto resultante se lavó nuevamente tres veces con un producto de lavado acuoso en el que se disolvió sacarosa al 30 % durante 15 minutos, y el tejido de la piel se cortó a un grosor de 10  $\mu\text{m}$ .
- 10 El tejido preparado se tiñó con hematoxilina Harris durante 30 segundos a  $25^{\circ}\text{C}$  y se lavó con agua durante 10 minutos. Además, el tejido resultante se tiñó con eosina durante 1 minuto a  $25^{\circ}\text{C}$  y se lavó dos veces con alcohol al 95 % durante 10 segundos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el tejido se lavó dos veces con alcohol al 100 % durante 10 segundos, se hizo reaccionar con xileno durante 2 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  y se observó usando un microscopio (Nikon, ECLIPS E600W, Japón). La morfología del folículo piloso se pudo observar a través de la tinción H&E, y se confirmó un ciclo de crecimiento del cabello.
- 15

### 8. Inmunohistoquímica

- Se fijó una muestra mediante una reacción con paraformaldehído al 4 % (PFA, Sigma, Estados Unidos) durante 15 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Después de 15 minutos, la muestra se lavó con PBS frío, se añadió Triton X-100 al 0,3 % (Sigma, Estados Unidos) usando PBS y se hizo reaccionar con la muestra durante 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  para que los anticuerpos inmunes penetraran fácilmente en la muestra.
- 20

- Luego, la muestra se lavó tres veces durante 5 minutos, y se bloqueó en PBS que contenía BSA al 1 % durante 1 hora a  $25^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los anticuerpos primarios de conejo Ki-67 (1:250, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y PCNA de ratón (1:250, Abcam, Cambridge, Reino Unido) se hicieron reaccionar con la muestra durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Además, se agregaron anticuerpos secundarios de conejo Cy3 (1:400, Jackson Laboratory, California, Estados Unidos) y ratón Alexa488 (1:400, Jackson Laboratory, California, Estados Unidos) para realizar una reacción adicional durante 1 hora y 30 minutos a las  $25^{\circ}\text{C}$ .
- 25

- Posteriormente, los anticuerpos secundarios se descartaron y se lavaron tres veces con PBS en un lugar oscuro para no exponerlos a la luz. Un núcleo de la muestra se tiñó con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DAPI (1:1000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 5 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , y se montó en cada uno de un microscopio fluorescente (Nikon) y un microscopio confocal (ZEISS, LSM700/Alemania, Nikon Eclipse TE2000-U/Japón) para observación.
- 30

### 9. Análisis CCK8

Para detectar la proliferación celular, se trataron 400  $\mu\text{l}$  de un medio de cultivo y 40  $\mu\text{l}$  de un reactivo de un kit de recuento celular (CCK-8, Dojindo, Estados Unidos) durante 1 hora bajo 5 % de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , y el medio de cultivo se transfirió a una placa de 96 pozos para detectar una densidad óptica (DO) a 450 nm usando un espectrofotómetro.

### 10. Análisis cuantitativo utilizando tinción de vivas/muertas

- La tinción de vivas/muertas es un procedimiento para teñir células vivas y células muertas usando dos colores de sondas fluorescentes. Las células muertas se muestran en rojo a una longitud de onda de canal de 565 a 605 nm debido al homodímero de etidio (EthD), y las células vivas se muestran en verde a una longitud de onda del canal de 440 a 480 nm debido a la calceína.

- 40 Se retiró un sobrenadante del medio acondicionado, y los gránulos se lavaron con PBS una o dos veces, y luego se tiñeron con una mezcla en la que se mezclaron un reactivo 2 mM de un kit de viabilidad/citotoxicidad vivas/muertas (Invitrogen), 20  $\mu\text{l}$  de EthD-1 y 5  $\mu\text{l}$  de Calceína AM 4 mM en 10 ml de PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La tinción se usó para observar células vivas o células muertas a través de una imagen fluorescente Incucyte™ FLR (Essen Bioscience Inc. USA, ZEISS, LSM 510 META).

### **Ejemplo 1: Efecto de las células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical humano (hUCB-MSC) sobre el crecimiento del cabello**

#### 1-1. Observación del crecimiento del cabello a simple vista.

- Se indujo una fase telógena en un ratón C3H, y se inyectó PBS en la mitad de la parte posterior del ratón como control negativo, y se inyectó un grupo hUCB-MSC 3 y un grupo celular HEK293 a  $1 \times 10^6$  células/100  $\mu\text{l}$  y  $5 \times 10^5$  células/100  $\mu\text{l}$ , respectivamente, una vez en un punto de la otra mitad del lomo del ratón como grupo de prueba.
- 50

Posteriormente, se observó el crecimiento del cabello del ratón durante 5 semanas, y el resultado se muestra en la Figura 2)

5 Como se ve en la Figura 2, solo en el grupo hUCB-MSC, el ratón C3H mostró crecimiento de cabello al convertir un ciclo capilar de la fase telógena a la fase anágena. Aquí, el cabello era más largo y crecía en un rango más amplio cuando las células se inyectaban a  $5 \times 10^5$  células, en comparación con la inyección de  $1 \times 10^6$  células, y el grupo 2 de células madre tenía un diámetro de  $8 \mu\text{m}$  o menor. Es decir, cuando las hUCB-MSC que tenían un diámetro de  $8 \mu\text{m}$  o menor se inyectaron a  $5 \times 10^5$  células/100  $\mu\text{l}$ , se exhibió el efecto de crecimiento capilar más excelente.

1-2. Observación del folículo piloso.

A continuación, los inventores trataron de observar el efecto de hUCB-MSC sobre el crecimiento del cabello y el folículo piloso involucrado en el crecimiento del cabello en un estado de tejido de ratón C3H.

10 Para este fin, se fabricó un fragmento de tejido mediante el procedimiento descrito anteriormente, y se tiñó mediante tinción con H&E para observar el número y la longitud de los folículos pilosos, y el grosor del tejido de piel.

15 Como resultado, como se muestra en la Figura 3, en el grupo en el que se inyectaron las hUCB-MSC de acuerdo con la presente invención, se observó un número considerablemente alto de folículos pilosos, la longitud del folículo piloso era larga y el grosor del tejido de la piel era grueso dos veces o más. Aquí, cuando se inyectaron  $5 \times 10^5$  células de las hUCB-MSC que tenían un diámetro de  $8 \mu\text{m}$  o menor, se obtuvieron el mayor número y la mayor longitud de los folículos pilosos y el mayor grosor de la piel.

1-3. Observación del efecto del medio acondicionado sobre el crecimiento de cabello.

Los medios acondicionados preparados por el procedimiento descrito anteriormente (Ejemplo de preparación 1-(2)) se administraron a ratones por el mismo procedimiento, y se observó el crecimiento del cabello en los ratones después de 8 semanas, y el resultado se muestra en la Figura 6)

20 Como se ve en la Figura 6 que muestra imágenes de ratón y folículo piloso para hUCB-MSC, cuando se administró el medio acondicionado de hUCB-MSC con un diámetro de  $8 \mu\text{m}$  o menor, se mostró un excelente efecto de crecimiento del cabello, y particularmente, en comparación con un medio acondicionado de hUCB- Las MSC que tienen un diámetro de  $20 \mu\text{m}$  o más, también se puede ver en la imagen del folículo piloso que había diferencias considerables en el número y la longitud de los folículos pilosos. Según el resultado, se puede confirmar que las células madre que tienen un diámetro de  $8 \mu\text{m}$  o menor y un medio acondicionado de las mismas tuvieron el efecto de crecimiento del cabello más excelente.

**Ejemplo 2. Efecto de las células madre sobre el crecimiento de cabello según diversos tejidos de origen.**

2-1. Observación del crecimiento del cabello a simple vista.

30 Los inventores compararon los efectos del crecimiento del cabello de las células madre mesenquimales derivadas de adiposidad (Adipose-MSC, AD-MSC), células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (médula ósea-MSC, BM-MSC) y células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical (hUCB-MSC) para examinar la influencia de los tejidos de origen de las células madre en el crecimiento del cabello.

35 Para este fin, después de que el ratón C3H fuera inducido a una fase telógena, se inyectaron AD-MSC, BM-MSC y hUCB-MSC en un punto una vez a una cantidad de  $5 \times 10^5$  células, y se observó crecimiento de cabello a las 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> semanas.

El resultado se muestra en la Figura 4)

40 Como se muestra en la Figura 4, el ratón C3H en el que se inyectaron hUCB-MSC tuvo el efecto de crecimiento del cabello más excelente. Primero se observó un fenómeno de crecimiento del cabello a la 5<sup>a</sup> semana, y se observó un fenómeno en el que el cabello creció en 90 % o más del área total del ratón al menos la 7<sup>a</sup> semana en el grupo en el que se inyectaron UCB-MSC.

Además, en comparación con un grupo Minoxidil<sup>®</sup> utilizado como control positivo y un grupo PRP, cuando se inyectaron hUCB-MSC, se observó un efecto de crecimiento del cabello mucho mayor.

2-2. Observación del folículo piloso

45 Además, a la 8<sup>a</sup> semana después del trasplante de células adicional, se observó un folículo piloso en el tejido de la piel del ratón C3H.

Como resultado del análisis del número y la longitud de los folículos pilosos, y el grosor del tejido de la piel a través de la tinción H&E, como se muestra en la Figura 5, en comparación con AD-MSC y BM-MSC, cuando se usó hUCB-MSC, se observó el mayor número y la mayor longitud de folículos pilosos, y el grosor del tejido de la piel era más grueso dos veces o más.

50 2-3. Medio acondicionado de células madre derivadas de otros tejidos.

Los medios acondicionados preparados por el procedimiento descrito anteriormente (Ejemplo de preparación 1-(2)) se administraron a un ratón por el mismo procedimiento descrito anteriormente para observar el crecimiento del cabello a la 8ª semana, y el resultado se muestra en la Figura 6)

5 Como se ve en la imagen de la Figura 6, en comparación con un medio acondicionado AD-MSK y un medio acondicionado BM-MSK, cuando se usó el medio acondicionado hUCB-MSK, se observó el mayor número y la mayor longitud de folículos pilosos, y el grosor del tejido de la piel fue mayor.

**Ejemplo 3: Observación de la generación de células de papila dérmica**

10 Ya se sabe que el crecimiento del cabello está profundamente relacionado con la proliferación celular de una parte de la papila dérmica (DP). Basados en este hecho, los inventores intentaron confirmar la proliferación celular de la parte DP usando anticuerpos PCNA y Ki67.

Como resultado, como se muestra en la Figura 5, entre las células madre adultas derivadas de diversas fuentes, cuando se inyectó hUCB-MSK, se observó un considerable efecto de proliferación celular en la parte DP.

15 Además, como se muestra en la Figura 6, entre los medios condicionados de células madre adultas derivadas de diversas fuentes, cuando se inyectó hUCB-MSK, se observó un considerable efecto de proliferación celular en la parte DP.

De acuerdo con el resultado anterior, entre las células madre mesenquimales derivadas de diversos tejidos, se observó que las células madre mesenquimales derivadas de la sangre de cordón umbilical y un medio acondicionado de las mismas son la fuente que muestra el mayor efecto de crecimiento del cabello.

**Ejemplo comparativo 1: Efecto de hUCB-MSK sobre el crecimiento de cabello de tamaño pequeño**

20 (1) Experimento *in vitro*

Para comparar los efectos del crecimiento del cabello de las células madre de acuerdo con un tamaño, se mezclaron para analizar hUCB-MSK de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor, hUCB-MSK de gran tamaño que tienen un diámetro de 20 µm o más, y heterocélulas en las cuales estaban mezclados tamaños diversos. Las AD-MSK y las BM-MSK se prepararon en un estado heterocelular. Minoxidil® y PRP se usaron como controles positivos, y las células HEK293 y los medios sin procesar se usaron como controles negativos.

Además, para observar el efecto sobre la proliferación de células DP y células HaCaT, las células se trataron *in vitro* en una cámara superior usando un sistema de cultivo concurrente. Las células se trataron durante un total de 96 horas para observación, y la proliferación celular en CCK-8 se detectó mediante recuento celular cada 24 horas. Los resultados son visibles en las Figuras 7 y 8.

30 Se confirmó que los niveles de proliferación de las células DP y HaCaT eran más altos a las 72 horas, y las hUCB-MSK mostraron una proliferación celular dos veces o más alta que las heterocélulas.

Además, en términos de la diferencia en la proliferación de acuerdo con el tamaño de las hUCB-MSK, en las hUCB-MSK de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor, la proliferación de las células DP fue 4,8 veces o más que la del grupo de control (Figura 7).

35 Además, las células madre sembradas en la cámara superior en el sistema de cultivo concurrente se cultivaron en diversos números de 500 a 20.000 células, y se mostró la mayor proliferación celular cuando el número de células madre fue de 15.000, (Figura 8).

Además, se confirmó mediante la tinción de vivas/muertas que las hUCB-MSK de tamaño pequeño que tenían un diámetro de 8 µm o menor tenían el mayor efecto de proliferación de células DP (Figura 8).

40 (2) Experimento *in vivo*

Al igual que el resultado *in vitro* descrito anteriormente en el que se observó el crecimiento del cabello de acuerdo con el tamaño de una célula, los resultados obtenidos al confirmar el efecto del crecimiento del cabello *in vivo* al inyectar células en el ratón C3H se muestran en la Figuras 5 y 6.

45 Según el resultado obtenido mediante tinción con H&E, las hUCB-MSK de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8 µm o menor y un medio acondicionado de las mismas exhibieron excelentes efectos en la cantidad y longitud de los folículos pilosos y el grosor de la piel. El mismo resultado se obtuvo mediante la comparación examinada utilizando PCNA y tinción fluorescente Ki67.

50 De acuerdo con tales resultados, se observó que las células madre que tenían un diámetro pequeño de 8 µm o menor, en particular, las células madre derivadas de sangre de cordón umbilical de tamaño pequeño que tenían un diámetro de 8 µm o menor y un medio acondicionado de las mismas, estimulaban la proliferación de células DP y el crecimiento de un folículo piloso y, por lo tanto, el crecimiento del cabello, exhibiendo así la función más excelente en la prevención

de la caída del cabello y la estimulación del crecimiento del cabello, y en comparación con el cultivo de las células madre heterogéneas simplemente sin aislamiento en un tamaño mostrado en el caso convencional, se exhibió un efecto particularmente sobresaliente.

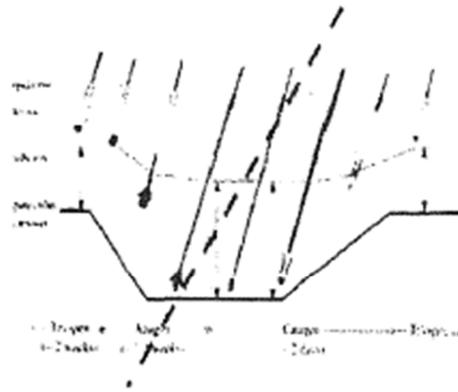
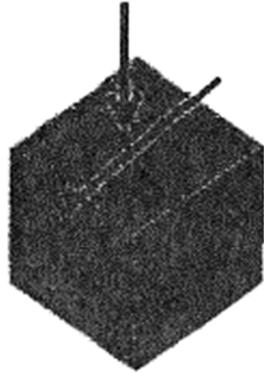
5 Además, cuando se usaron células de gran tamaño con un diámetro de 20  $\mu\text{m}$  o más y se usó un medio acondicionado de las mismas, no hubo un efecto significativo sobre la estimulación del crecimiento del cabello, y por lo tanto se vio que la prevención de la pérdida de cabello y la estimulación del crecimiento del cabello de las células madre eran influenciadas notablemente por el tamaño de las células madre.

10 De acuerdo con la presente invención, las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o un medio acondicionado de las mismas estimula la actividad de las células madre del folículo piloso para reducir el tiempo de conversión de una fase telógena en una fase anágena en un ciclo capilar y aumentar la generación de células de la papila dérmica, exhibiendo así un excelente efecto de prevención de pérdida de cabello y estimulante del crecimiento del cabello, y por lo tanto es muy útil en un campo aplicable.

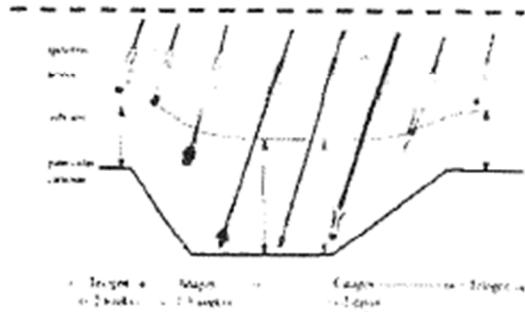
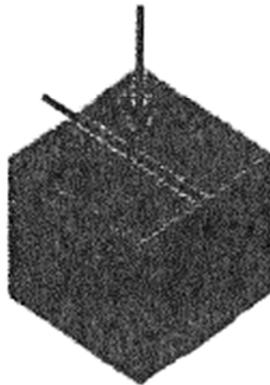
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para su uso en la terapia de pérdida de cabello para prevenir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello, que comprende:
- 5 células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor, o un medio acondicionado de las mismas como ingrediente activo.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor incluyen al menos una seleccionada del grupo que consiste en células madre adultas humanas derivadas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, sangre, hígado e intestino, piel, tracto gastrointestinal, placenta, nervio, suprarrenal, epitelio y útero, y células madre embrionarias.
- 10 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor se derivan de médula ósea, sangre de cordón umbilical o tejido adiposo.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor se derivan de sangre de cordón umbilical.
- 15 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor son células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la sangre de cordón umbilical se deriva de humanos.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medio acondicionado incluye un medio libre de suero de queratinocitos (K-SFM).
- 20 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o el medio acondicionado de las mismas activa las células madre del folículo piloso.
9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que las células madre de tamaño pequeño que tienen un diámetro de 8  $\mu\text{m}$  o menor o el medio acondicionado de las mismas tienen las siguientes funciones:
- 25 (i) reducción del tiempo para convertir una fase telógena en una fase anágena en un ciclo capilar;
- (ii) normalización de la regulación del ciclo capilar; y
- (iii) aumento en la generación de células de la papila dérmica.
10. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición es una composición farmacéutica.
- 30 11. Uso cosmético no terapéutico de una composición cosmética para prevenir la caída del cabello y estimular el crecimiento del cabello, en el que la composición comprende células madre de tamaño pequeño o un medio acondicionado de las mismas como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la administración se realiza mediante administración percutánea usando inyección.
- 35 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la inyección es un procedimiento para administrar la composición a la dermis de un objetivo mientras se coloca hacia arriba el agujero de la aguja de la jeringa.
14. El uso cosmético no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la composición cosmética se usa mediante administración percutánea usando inyección.
- 40 15. El uso cosmético no terapéutico según la reivindicación 14, en el que la inyección es un procedimiento para administrar la composición a la dermis de un objetivo mientras se coloca hacia arriba el agujero de la aguja de la jeringa.

[FIG. 1]

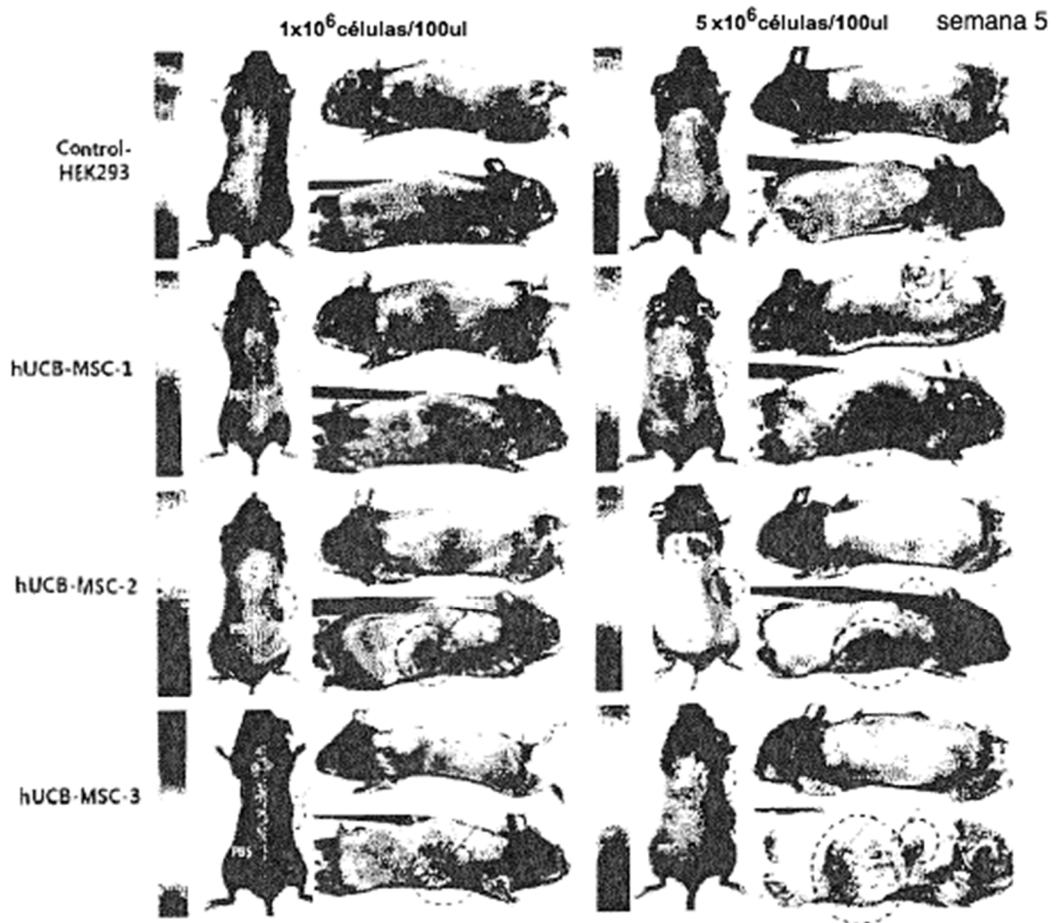


SECCIÓN TRANSVERSAL PARA OBERVAR LA LONGITUD DEL FOLÍCULO PILOSO

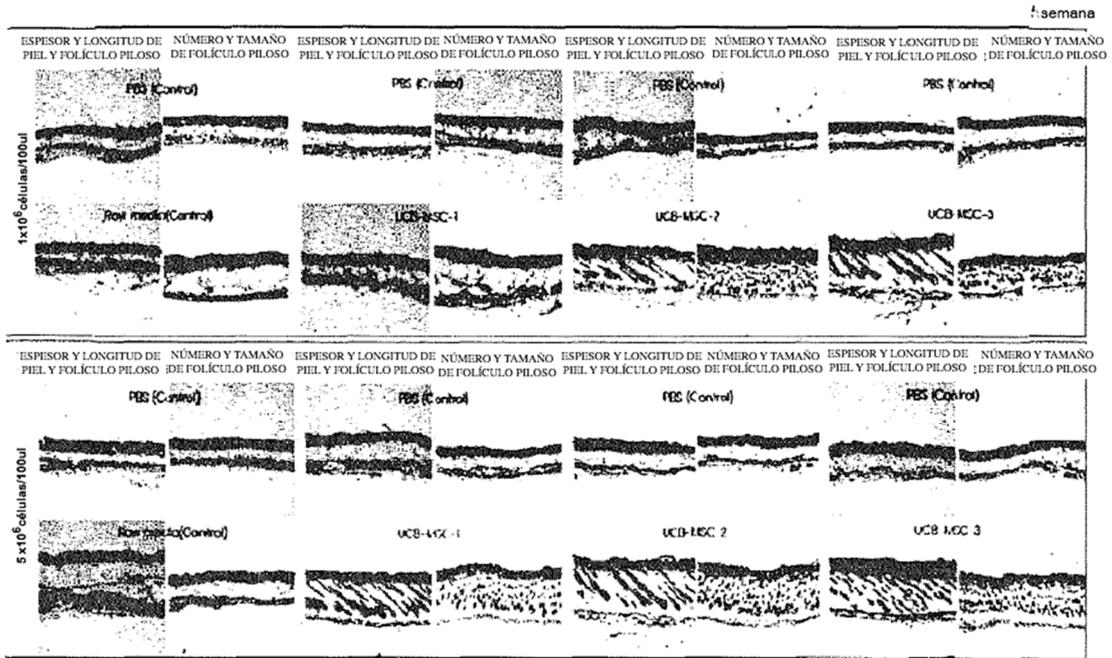


SECCIÓN TRANSVERSAL PARA OBERVAR EL NÚMERO DE FOLÍCULOS PILOSOS

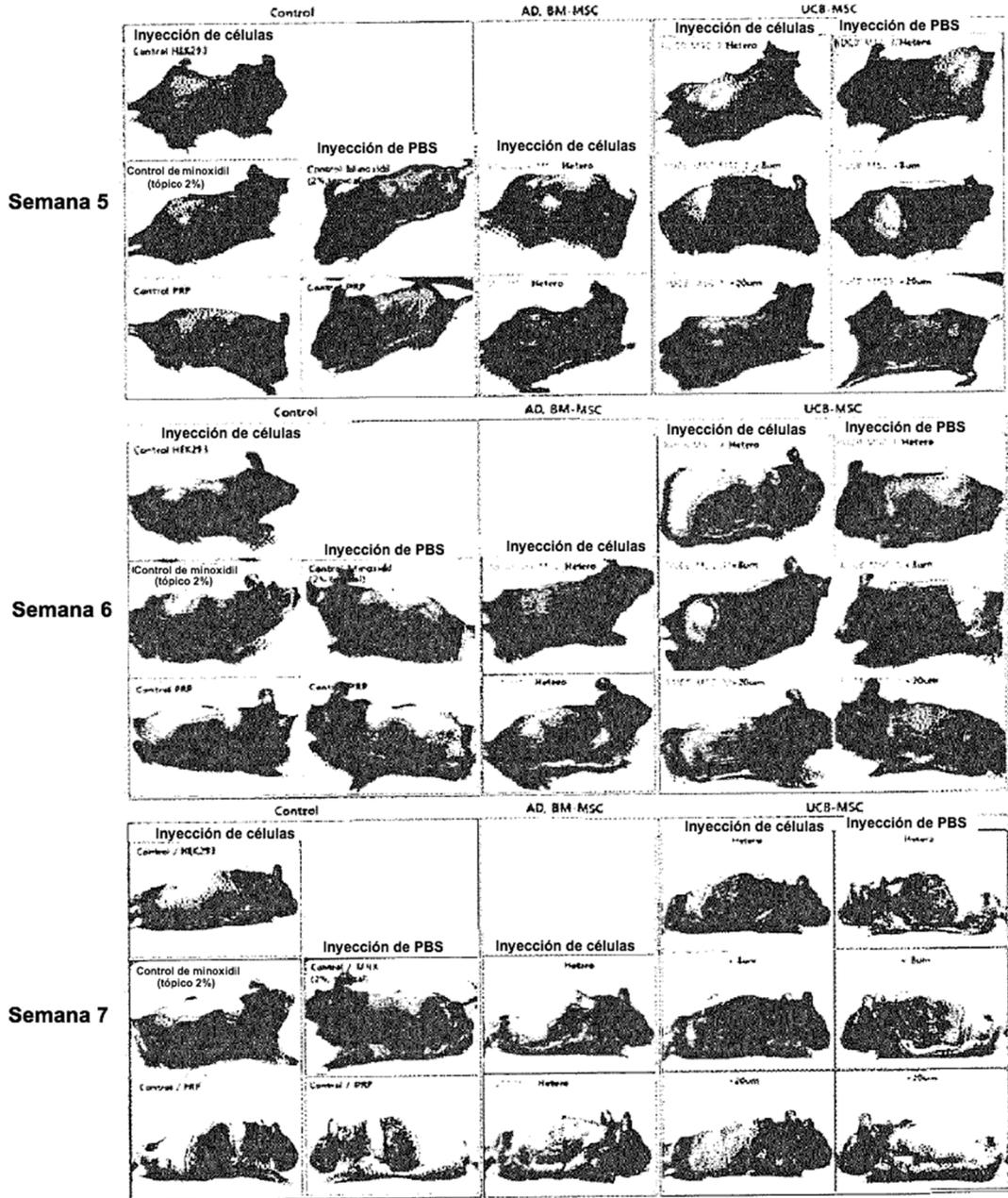
[FIG. 2]



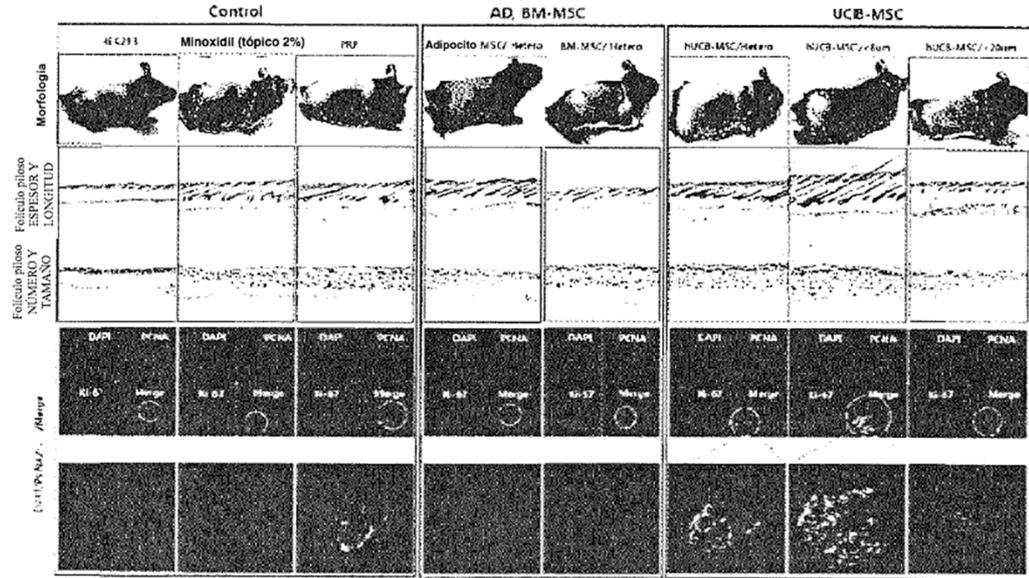
[FIG. 3]



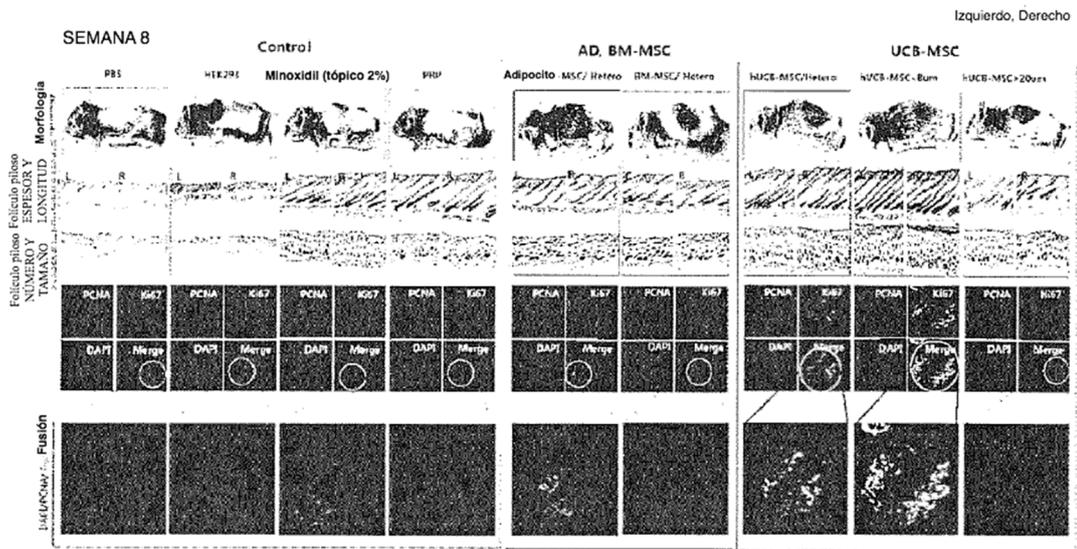
[FIG. 4]



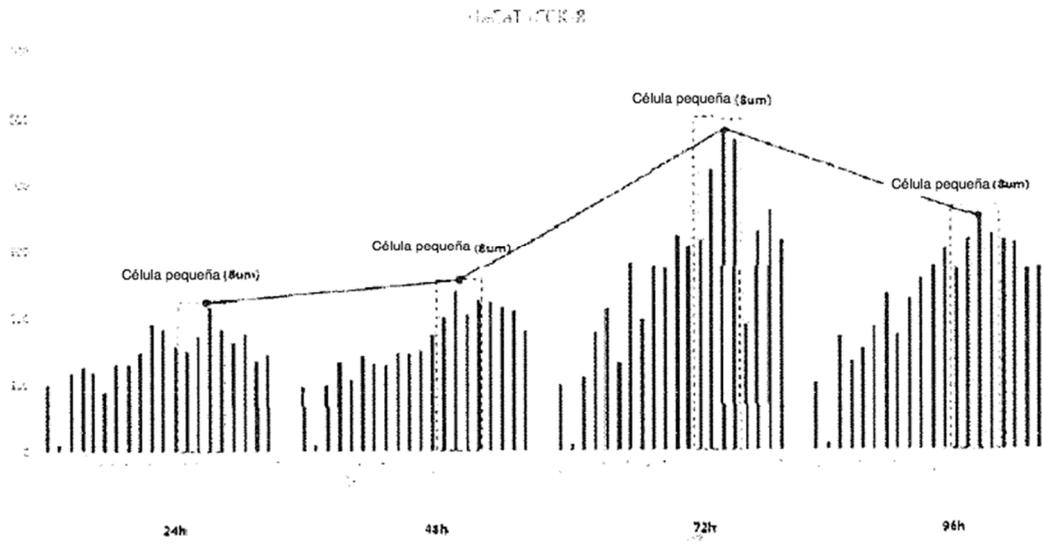
[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]



[FIG. 8]

