(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0022758
(43) 공개일자 2016년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 35/39* (2015.01)
A61K 38/28 (2006.01) *C07K 14/62* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0676 (2013.01)
A61K 35/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0061406
(22) 출원일자 2015년04월30일
심사청구일자 2015년04월30일
(30) 우선권주장
1020140107546 2014년08월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박주원
서울특별시 양천구 목동동로 350, 512동 106호 (목동, 목동신시가지아파트5단지)
김소연
서울특별시 마포구 숭문2길 20, 3층 (염리동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 12 항

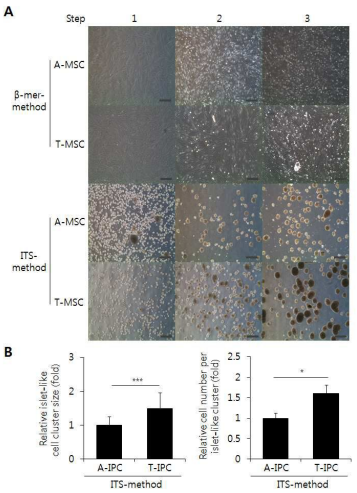
(54) 발명의 명칭 **편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 편도 유래 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화방법 및 이를 이용한 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법은 인슐린 분비 세포로의 높은 분화능을 보이기 때문에 짧은 시간 내 대량의 인슐린 분비 세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 인슐린 분비 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 자가 면역의 문제를 최소화하여 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/28 (2013.01)
C07K 14/62 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 2500/25 (2013.01)
C12N 2500/33 (2013.01)
C12N 2501/335 (2013.01)
C12N 2506/13 (2013.01)

(72) 발명자
유경하
서울특별시 강남구 영동대로118길 76, 102동 202호 (삼성동, 삼성동대우멤버스카운티1차)
정성철
서울특별시 서초구 명달로4길 68, A동 502호 (서초동, 서초네스피아)
우소연
서울 동대문구 정릉천동로 36, 102동 601호 (용두동, 래미안허브리츠)
김한수
서울특별시 영등포구 의사당대로 110, E동 503호 (여의도동, 미성아파트)
조인호
충청남도 천안시 서북구 천안대로 999-7, 101동 2001호 (두정동, 이안더센트럴)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711001140
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 새로운 세포치료제로서 편도줄기세포의 발굴 및 기능검색연구
기 여 율 60/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711003214
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업
연구과제명 스핑고지질의 지방산 길이 변화가 당뇨병에 미치는 영향
기 여 율 20/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711002168
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 BINT 융합기술기반 분화유도 시스템에 의한 줄기세포 기능규명
기 여 율 20/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 첨가하여 배양하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 1일 내지 5일 동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 배양은 2일 내지 7일 동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 배양은 2일 내지 7일 동안 수행되는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 인슐린-트랜스페린-셀레늄는 인슐린의 농도 7 내지 12 mg/l, 트랜스페린의 농도 3.5 내지 7.5 mg/l 및 셀레늄의 농도 3 내지 7 ng/ml로 포함하는 것인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 타우린은 0.1 내지 0.5 mM로 포함하는 것인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 니코틴아미드는 7 내지 12 mM로 포함하는 것인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 글루카곤유사펩티드는 7 내지 12 nM로 포함하는 것인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 엑센딘-4는 7 내지 12 nM로 포함하는 것인 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법.

청구항 10

인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 1차 배지;

인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 포함하는 2차 배지; 및

인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 포함하는 3차 배지;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포 분화 유도용 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법에 따라 제조된 인슐린 분비 세포.

청구항 12

제11항에 따른 인슐린 분비 세포를 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화방법 및 이를 이용한 세포 치료제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되고, 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있는 특성이 있으며, 분화 자극에 따라 상이한 세포로도 분화될 수 있는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0003] 줄기세포는 그 분화능에 따라 만능(pluripotency), 다분화능(multipotency) 및 단분화능(unipotency) 줄기세포로 나눌 수 있다. 만능줄기세포(pluripotent stem cells)는 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 전분화능(pluripotency)의 세포이며, 일부 줄기세포는 다분화능 또는 단분화능의 잠재력을 지닌다.

[0004] 상기 줄기세포들이 가지는 분화능을 기초로 세포 치료제로 이용 가능성이 있어 이와 관련된 연구 개발이 활발히 진행중이다. 하지만, 배아 줄기세포를 이용한 세포 치료제의 경우 윤리적 문제나 조직 적합성 불일치 문제가 제기되고 있으며, 역분화 줄기세포를 세포 치료제로 사용할 경우 종양 발생 가능성의 문제가 있다.

[0005] 이에 따라, 분화능이 낮은 것으로 알려져 있지만 상대적으로 안전한 중간엽줄기세포를 이용한 연구가 많이 진행되고 있다. 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSCs)는 성체 골수 등에 있는 multi-potential non-hematopoietic progenitor cell로서 지방, 연골, 뼈, 근육, 피부 등 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 이러한 중간엽 줄기세포를 이용하여 다양한 조직 재생을 위한 임상 연구가 진행되고 있으며, 장기이식 분야에도 적용가능성을 보이고 있다.

[0006] 그러나, 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 조금 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 증식능력이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0007] 한편, 당뇨병은 원인에 따라 크게 두 가지 형태 (제1형, 제2형)로 구분된다. 제 1형 당뇨병의 경우 자신의 면역

세포가 인슐린 생산세포를 파괴하여 발생하는 당뇨병으로 인슐린 생산세포가 부족하여 혈당을 조절하지 못하기 때문에 발생한다. 제 2형 당뇨병의 경우 다양한 원인에 의하여 신체 내 장기/조직/세포 등이 인슐린에 대한 저항성에 기인하는 것으로 결국에는 고혈당에 기인한 인슐린 생산세포의 기능저하 및 소실로 혈당의 조절이 원활하지 않게 되며 결과적으로 고혈당을 보이는 당뇨병 증상과 함께 그에 따른 합병증이 유발되게 된다.

[0008] 이렇듯 인슐린을 생산하는 세포의 소실에 따른 당뇨병의 치료수단으로 동종 혹은 이종 유래의 췌도 세포 이식연구가 진행되고 있으나 췌도 이식을 받은 환자의 경우 평생 동안 면역조절제를 복용해야 하는 불편함이 있으며 그 성공률이 1년 이내 62.5%에서 시간이 경과함에 따라 감소할 뿐만 아니라 췌도 이식이 요구되는 환자 수에 비하여 공여자의 수가 턱없이 부족한 상황이다.

[0009] 부족한 췌도 공여자에 대한 또 다른 대안으로 줄기세포로부터 인슐린을 생산하는 세포를 분화/증식시켜 환자에 이식함으로써 당뇨병을 치료하고자 하는 연구가 진행되고 있으나 성과가 미미한 상황이다. 실제 부족한 췌도를 대체할 목적으로 생체 외에서 배아줄기세포, 역분화 줄기세포 등 다양한 세포를 이용하여 인슐린을 생산하는 세포로 분화시킨 후 이식함으로써 당뇨병을 치료하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으나 분화된 세포의 경우 증식이 일어나지 않는 현상을 고려할 때 당뇨병 치료에 필요한 양의 세포를 얻기 위해서는 천문학적 비용이 소요될 것으로 예상됨에도 불구하고 효율이 매우 낮고 안전성에 대한 우려로 인하여 임상적용이 불가능한 상황이다. 즉, 인슐린 세포 분화용 배지를 이용하여 인슐린 세포로 분화를 유도하는 연구들이 일부 있지만, 분화 효율 면에서 그 이용이 매우 제한적이다.

[0010] 또한, 상이한 유전적 기원, 유래 및/또는 배경을 가지는 중간엽 줄기세포들의 경우 중간엽 줄기세포를 규정하는 일부 기준들에 대해서는 서로 유의적 차이를 나타내지 아니하지만 통상적으로 각각의 생체 내 활성에 있어서는 매우 큰 차이를 나타내는바, 특정 유래의 줄기세포로부터 분화 방법 및 분화된 세포 특성에 대한 확인 역시 필요하다.

[0011] 이에 따라, 인슐린 세포로의 높은 분화능을 보일 수 있는 특정 줄기세포로부터 최적의 분화 방법을 확인하여 인체 적용에 적합한 인슐린 세포 및 인슐린 생산 방법을 확보하는 방안에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2015-0020702호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0143363호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[0014] (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 첨가하여 배양하는 단계; 및

[0015] (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 1차 배지;

[0017] 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 포함하는 2차 배지; 및

[0018] 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 포함하는 3차 배지;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 상기 분화 방법에 따라 제조된 인슐린 분비 세포를 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 상기 인슐린 분비 세포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명자들은 인체 적용에 적합한 인슐린 분비 세포의 대량 생산 방법을 연구하던 중, 편도 유래 중배엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포를 단기간에 대량 생산하는 방법을 발명하여 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명에 있어서, 편도 유래 중간엽 줄기세포란 목의 안쪽과 코의 뒷부분에 위치하여 외부에서 침입하는 세균 등의 물질로부터 일차적으로 우리 몸을 방어함과 동시에 림프상피 면역조직으로 작용을 수행하는 조직인 편도에서 유래된 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 새로운 세포로 분화하는 능력을 가진 미분화된 줄기세포를 의미한다.

[0023] 본 발명에 있어서, 인슐린이란 체내에서 탄수화물 및 지방 대사를 조절하는 호르몬이다. 이자(pancreas)의 랑게르한스 섬 β-세포(β-cells of islets of Langerhans)에서 분비되며, 혈액 속의 포도당 수치인 혈당량을 일정하게 유지시키는 역할을 한다. 즉, 혈중 글루코스의 농도가 일정수준 이상으로 높아지면 인슐린이 분비되며, 혈액 내의 포도당을 세포 내로 유입해 간과 근육에 다시 다당류(예를 들어 글리코겐)의 형태로 저장하는 작용을 촉진시킨다.

[0024] 본 발명에 있어서, 인슐린 분비 세포란 상기 인슐린을 세포 내에서 합성하여 생산 및 분비하는 모든 형태의 세포를 의미한다.

[0025] 본 발명은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[0026] (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 첨가하여 배양하는 단계; 및

[0027] (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법은 특정의 방법을 이용하여 편도 유래 중간엽 줄기세포를 분화시킴으로써 타 유래의 성체 줄기세포를 사용한 방법과 대비하여 현저한 분화능 및 증식능을 보인다. 편도 유래 중간엽 줄기세포는 편도비대증에 대한 치료를 위해 시행하는 편도절제술 과정에서 나오게 되는 버려지는 편도에서 분리한 줄기세포로써, 버려지는 조직을 이용할 수 있다는 점에서 조직 수급이 수월하다.

[0029] 또한, 본 발명에 따른 분화 방법으로 편도 유래 중간엽 줄기세포를 이용하였을 경우 타 유래 줄기세포에 비해 똑같은 세포 양으로부터 얻어지는 인슐린 양이 현저히 높으며, 얻어지는 인슐린 분비 세포 숫자도 월등히 높다. 즉, 높은 수준의 인슐린 함량 및 빠른 분화 속도를 볼 때, 타 유래 줄기세포로부터의 분화 또는 타 분화 방법과 대비하여 현저한 효과를 가진다.

[0030] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법은 (a) 편도 유래 중간엽 줄기세포를 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0031] 상기 (a) 단계의 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)는 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄을 포함하는 보충액으로써, 상업적으로 이용가능한 제품을 이용할 수 있으며, 상기 각각의 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄 성분을 조합하여 사용할 수도 있다. 편도 유래 중간엽 줄기세포의 분화에 있어서, 인슐린은 분열 촉진 효과 등을 가지며, 트랜스페린은 세포로 철을 이동시키는 효과 등을 가지며, 셀레늄은 글루타티온 과산화효소로의 효과를 가져 편도 유래 중간엽 줄기세포의 분화와 성장을 돕는다.

[0032] 상기 ITS의 인슐린의 농도는 7 내지 12 mg/l, 트랜스페린의 농도는 3.5 내지 7.5 mg/l 및 셀레늄의 농도는 3 내지 7 ng/ml인 것이 바람직하고, ITS의 인슐린의 농도는 9 내지 11 mg/l, 트랜스페린의 농도는 4.5 내지 6.5 mg/l, 셀레늄의 농도는 4 내지 6 ng/ml인 것이 보다 바람직하다. 상기 (a) 단계의 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)를 포함하는 배지에서 배양은 1 내지 5일, 바람직하게 1 내지 3일간 수행

할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법은 (b) 상기 (a) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 첨가하여 배양하는 단계를 포함한다. 인슐린-트랜스페린-셀레늄은 앞서 언급한 바와 같다.

[0034] 타우린은 아미노술폰산의 일종으로 인슐린 분비 세포로의 분화에 있어서 인슐린 분비능을 증가시키는 역할을 한다.

[0035] 니코틴아마이드는 비타민 B 복합체의 일종으로 인슐린 분비 세포로의 분화에 있어서 미분화상태의 세포를 인슐린 분비 세포로 성숙시키는 역할을 한다.

[0036] 상기 (b) 단계에서 인슐린-트랜스페린-셀레늄의 농도는 앞서 언급한 바와 같으며, 타우린의 농도는 0.1 내지 0.5 mM, 바람직하게 타우린의 농도는 0.2 내지 0.4 mM로 사용할 수 있으며, 니코틴아마이드의 농도는 7 내지 12 mM, 바람직하게 9 내지 11 mM로 사용할 수 있다. 상기 (b) 단계의 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 포함하는 배지에서 배양은 2 내지 7일, 바람직하게 3 내지 6일간 수행할 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법은 (c) 상기 (b) 단계에서 배양된 세포에 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 첨가하여 배양하는 단계를 포함한다. 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드는 앞서 언급된 바와 같다.

[0038] 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1)은 프로글루카곤 유전자의 전사 생성물로부터 유래된 인크레틴의 일종으로 인슐린 분비 세포로의 분화를 유도하는 역할을 한다.

[0039] 엑센딘-4(exendin-4)는 글루카곤유사펩티드 수용체 작용제의 일종으로, 인슐린 분비 세포로의 분화에 있어서 인슐린 분비 세포의 성장과 증식을 증가시키는 역할을 한다.

[0040] 상기 (c) 단계에서 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린 및 니코틴아미드의 농도는 앞서 언급한 바와 같으며, 글루카곤유사펩티드의 농도는 7 내지 12 nM, 바람직하게 9 내지 11 nM이며, 엑센딘-4의 농도는 7 내지 12 nM, 바람직하게 9 내지 11 nM이다. 상기 (c) 단계의 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 포함하는 배지에서 배양은 2 내지 7일, 바람직하게 3 내지 6일간 수행할 수 있다.

[0041] 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법의 배지는 Bovine serum albumin (BSA)을 추가로 포함할 수 있으며, BSA는 배지 총중량에 대하여 0.5 내지 3 중량%, 바람직하게 0.5 내지 1.5 중량%로 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 배양 배지는 이에 제한되지 않으나 High-glucose α-MEM, High-glucose DMEM, Low-glucose DMEM, High-glucose RPMI, Low-glucose RPMI 등으로부터 선택되는 배지를 사용할 수 있으며, 바람직하게 High-glucose α-MEM을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명은 또한, 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)을 포함하는 1차 배지;

[0044] 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린(taurine) 및 니코틴아미드(nicotinamide)를 포함하는 2차 배지; 및

[0045] 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린, 니코틴아미드, 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide, GLP-1) 및 엑센딘-4(exendin-4)를 포함하는 3차 배지;를 포함하는 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포 분화 유도용 조성물을 제공한다. 본 발명의 분화 유도용 조성물에 대해서, 상기 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법의 내용이 동일하게 적용가능하다.

[0046] 본 발명에 따른 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포 분화 유도용 조성물은 편도 유래 중간엽 줄기세포의 분화 유도에 현저한 효과를 가지며, 분화능 및 증식능을 크게 증가시킴으로써 인슐린 분비세포로의 분화를 빠르게 유도하고 인슐린을 대량 생산할 수 있게 한다.

[0047] 본 발명에 따른 제1차 배지에 포함되는 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS)은 각 성분별로 인슐린의 농도는 7 내지 12 mg/l, 트랜스페린의 농도는 3.5 내지 7.5 mg/l 및 셀레늄의 농도는 3 내지 7 ng/ml인 것이 바람직하고, ITS의 각 성분 별로 인슐린의 농도는 9 내지 11 mg/l, 트랜스페린의 농도는 4.5 내

지 6.5 mg/l, 셀레늄의 농도는 4 내지 6 ng/ml인 것이 보다 바람직하다.

[0048] 본 발명에 따른 제2차 배지에 포함되는 인슐린-트랜스페린-셀레늄의 농도는 앞서 언급한 바와 같으며, 타우린의 농도는 0.1 내지 0.5 mM, 바람직하게 타우린의 농도는 0.2 내지 0.4 mM로 포함될 수 있으며, 니코틴아마이드의 농도는 7 내지 12 mM, 바람직하게 9 내지 11 mM로 포함될 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 제3차 배지에 포함되는 상기 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 타우린 및 니코틴아미드의 농도는 앞서 언급한 바와 같으며, 글루카곤유사펩티드의 농도는 7 내지 12 nM, 바람직하게 9 내지 11 nM로 포함될 수 있으며, 엑센딘-4의 농도는 7 내지 12 nM, 바람직하게 9 내지 11 nM로 포함될 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한, 상기 분화 방법에 따라 제조된 인슐린 분비 세포를 제공한다.

[0051] 본원 발명에 따라 제조된 인슐린 분비 세포는 편도 유래 줄기세포와 대비하여 증가된 인슐린 분비를 보이는 인슐린 분비 세포로써, 타 유래 중간엽 줄기세포로부터 분화된 세포와 대비하여 전반적인 높은 인슐린 분비 발현을 보여, 인슐린 분비 세포로써 우수한 특성을 가짐을 알 수 있다.

[0052] 본 발명은 또한, 상기 인슐린 분비 세포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0053] 즉, 개체로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품으로 사용되어 당뇨병에 사용될 수 있다. 상기 당뇨병은 제1형 당뇨병 또는 제2형 당뇨병일 수 있다. 상기 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적 분야의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위투여형의 약학적 제제로 제형화시켜 투여할 수 있으며, 상기 제제는 1회 또는 수회 투여에 의해 효과적인 투여량을 포함한다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제, 주입제 등이 바람직하다. 또한, 상기 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용가능한 통상의 불활성 담체를 포함할 수 있다. 또한, 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여방법을 이용하여 이식 및 투여될 수 있으며, 바람직하게는 치료가 필요한 환자의 질환 부위에 직접 생착 또는 이식이 가능하나 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 투여는 카테터를 이용한 비외과적 투여 및 질환부위 절개 후 주입 또는 이식 등 외과적 투여방법 모두 가능하다. 투여량은 1.0×10^{4} 내지 1.0×10^{10}세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^{5} 내지 1.0×10^{9}세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0054] 본 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포로의 분화 방법은 인슐린 분비 세포로의 높은 분화능을 보이기 때문에 짧은 시간 내 대량의 인슐린 분비 세포의 확보가 가능하며, 본 발명에 따라 분화된 인슐린 분비 세포는 버려지는 자가 조직을 사용함으로써 자가 면역의 문제를 최소화하여 세포 치료제로써 우수한 이용가능성을 보인다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1은 인슐린 분비 세포로의 분화 방법에 따른 분화 기간별 형태 변화 및 Islet like cluster의 변화를 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 RT-PCR을 통해 인슐린 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 편도 유래 중간엽 줄기세포를 이용한 인슐린 분비 세포로의 분화 방법에 따른 분화 유도 후 분비된 인슐린 변화를 확인한 것이다.

도 4는 인슐린 분비 세포로의 분화 방법에 따른 단위 단백질 당 세포가 갖고 있는 인슐린 함량 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예, 제조예를 제시한다. 하기의 실시예, 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0057] **<실시예 1> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 배양**

[0058] 편도 유래 중간엽 줄기세포(Tonsil-derived mesenchymal stem cell, TMSC) 는 이대목동병원 이비인후-두경부외과에서 편도적출술을 시행하는 환자로부터 적출된 편도조직(4-20세의 저연령층 조직, 임상윤리위원회 심의 통과: ECT 11-53-02)으로부터 얻었다. 편도 조직을 3 mm 이하로 잘게 잘라서 210 U/ml 콜라게나제(collagenase) type I이 포함된 RPMI 1640 배지(Invitrogen)에 넣어 37 ℃에서 30분 반응시킨 후 철망에 걸러 세포를 분리하였다. 세포를 RPMI 1640/10% FBS 배지로 2번 씻어준 후 Ficoll-Paque(Sigma aldrich) 밀도 원심분리를 하여 단핵 세포를 분리하여 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium), 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신(Penicillin/Streptomycin) 배지에서 배양하였다. 48시간 후 바닥에 붙어 자라는 유착 세포를 얻어 5 passage가 되도록 계대배양하였다. 실험을 위해 편도 유래 중간엽 줄기세포는 passage 5 내지 7 사이를 실험에 사용하였다.

[0059] **<실시예 2> ITS 유도 편도 유래 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화**

[0060] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비세포로의 분화를 유도하기 위하여, 하기 [표 1]에 개시된 배지 조성으로 중간엽 줄기세포를 배양하였다.

[0061] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 준비한 편도 유래 중간엽 줄기세포를 High-glucose α-MEM(HyClone) 배지 하에 1% BSA(bovine serum albumin) (Sigma-aldrich), 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (insulin-transferrin-selenium; ITS, 인슐린(10 mg/L), 트랜스페린(5.5 mg/L), 셀레늄(5 ng/mL))(Sigma-aldrich)을 첨가하여 2일 동안 1차 배양하였다. 이어서, High-glucose α-MEM 배지 하에 1% BSA, 1x ITS, 0.3 mM 타우린(taurine)(Sigma-aldrich) 및 10 mM 니코틴아미드를 첨가하여 4일 동안 2차 배양하였다. 마지막으로, High-glucose α-MEM 하에 1% BSA, 1x ITS, 0.3 mM 타우린, 10 mM 니코틴아미드, 10 nM 글루카곤유사펩티드(glucagon like peptide-1; GLP-1)(Sigma-aldrich) 및 10 nM 엑센딘-4를 첨가하여 4일 동안 3차 배양하여 편도 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화를 유도하였다.

[0062] **[표 1] ITS 유도 분화 방법**

Step	분화 배지	기간 (일)
1	High-glucose α-MEM + 1% BSA + 1× insulin-trasferrin-selenium (ITS)	2
2	High-glucose α-MEM + 1% BSA + 1× insulin-trasferrin-selenium (ITS) + 0.3 mM taurine +10 mM nicotinamide	4
3	High-glucose α-MEM + 1% BSA + 1× insulin-trasferrin-selenium (ITS) + 3 mM taurine + 10 mM nicotinamide + 10 nM glucagon like peptide (GLP-1) + 10 nM exendin-4	4

[0063]

[0064] **<비교예 1> 지방 조직 유래 줄기세포의 배양**

[0065] 지방 조직 유래 줄기세포(adipose-derived stem cell, ASC)는 Life technology 회사로부터 구입하였다(R7788-110). 지방 조직 유래 줄기세포는 5 계대까지 구입처에서 지시한 대로 Complete MesenPRO RS™ Basal Medium(MesenPRO RS™ Basal Medium 500 ml, MesenPRO RS™ Growth Supplement 10 ml, to 2 mM L-글루타민(glutamine))에서 배양하였다. 본 실험을 위해 지방 조직 유래 줄기세포는 passage 5 내지 7 사이를 실험에 사용하였다.

[0066] **<비교예 2> 지방 조직 유래 줄기세포의 배양**

[0067] 상기 비교예 1에서 제조된 지방 조직 유래 줄기세포를 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 인슐린 분비 세포의 분화를 유도하였다.

[0068] **<비교예 3> 베타-머캅토에탄올 유도 인슐린 분비 세포의 분화**

[0069] 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비세포로의 분화를 유도하기 위하여, 하기 [표 2]에 개시된 배지 조성으로 중간엽 줄기세포를 배양하였다.

[0070] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 준비한 편도 중간엽 줄기세포를 High-glucose DMEM(HyClone) 배지 하에 5% FBS(fetal bovine serum)(HyClone), 1 mM 베타-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol)(Gibco) 및 10 mM 니코틴아미드(nicotinamide)(Sigma-aldrich)를 첨가하여 2일 동안 1차 배양하였다. 이어서, High-glucose DMEM 배지 하에 1 mM 베타-머캅토에탄올, 10 mM 니코틴아미드, 20 ng/ml bFGF(basic fibroblast growth factor)(Peprotech)

및 2 mM L-글루타민(L-glutamine)(Sigma-aldrich)를 첨가하여 8일 동안 2차 배양하였다. 마지막으로, High glucose serum free DMEM/F12(HyClone) 배지 하에 1 mM 베타-머캅토에탄올, 10 mM 니코틴아미드, 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)(Sigma-Aldrich), 10 ng/ml β-셀룰린(β-cellulin)(Sigma-aldrich), 2 nM 엑티빈 A(activin A)(Peprotech), 10 nM 엑센딘-4(exendin-4)(Sigma-aldrich) 및 100 pM HGF(hepatocyte growth factor)(Peprotech)를 첨가하여 14일 동안 3차 배양하여 편도 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화를 유도하였다.

[0071] 또한, 상기 비교예 1에서 준비한 지방 조직 중간엽 줄기세포에 대해서도 상기와 동일한 방법으로 인슐린 분비 세포의 분화를 유도하였다.

[0072] **[표 2] 베타-머캅토에탄올 유도 분화 방법**

[0073]

단계	배지 조성	기간 (일)
1	High-glucose DMEM + 5% FBS +1 mM β-mercaptoethanol + 10 mM nicotinamide	2
2	High-glucose DMEM +1 mM β-mercaptoethanol + 10 mM nicotinamide + 20 ng/ml bFGF + 2 mM L-glutamine	8
3	High-glucose serum-free-DMEM/F12 + 10 mM nicotinamide + 1 mM β-mercaptoethanol + 1% penicillin/streptomycin + 10 ng/ml β-cellulin + 2 nM activin A + 10 nM exendin-4 + 100 pM HGF	14

[0074] **<실시예 3> 편도 유래 중간엽 줄기세포의 분화 형태(morphology) 확인**

[0075] 상기 실시예 2, 비교예 2 및 비교예 3의 분화 방법으로 인슐린 분비 세포의 분화 단계에 따른 세포의 형태학적 변화를 현미경으로 확인하였으며, Islet-like cluster의 형성 정도를 세포 숫자 및 세포 크기 측면에서 확인하였다.

[0076] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0077] 도 1의 A는 상기 실시예 2 및 비교예 2(ITS-method), 비교예 3(β-Mer-method)의 방법에 따른 각각의 단계별 편도 유래 중간엽 줄기세포 및 지방 조직 유래 줄기세포의 분화 형태를 나타내며, 도 1의 B는 실시예 2 및 비교예 2 방법에 따른 췌장 소도 세포의 형성을 세포 크기 및 세포 수를 기초로 확인한 결과를 나타낸다.

[0078] 도 1의 A에서 확인되는 바와 같이, 편도 유래 중간엽 줄기세포(T-MSC)의 분화가 지방 조직 줄기세포(A-MSC)로부터의 분화와 대비하여 분화시 세포 수가 많으며 Cluster의 크기가 크게 형성되는 것이 확인되었다. 또한, 비교예 3의 방법과 대비하여서도 분화 시간이 크게 단축되었을 뿐만 아니라 분화능이 크게 증가된 것이 확인되었다. 특히, 분화 시간 측면에서 비교예 3의 방법이 3주 이상의 시간이 걸리는 것과 달리 본원 발명의 방법의 경우 약 10일 간의 분화 시간에 의해서도 현저한 효과가 있음이 확인되었다.

[0079] 또한, 도 1의 B에서 확인되는 바와 같이, 실시예 2의 방식으로의 분화시, 편도 유래 중간엽 줄기세포는 췌장 소도 세포 Cluster의 형성이 세포 크기 및 세포 수 측면에서 지방 조직 유래 줄기세포보다 현저한 것이 확인되었다.

[0080] 상기 결과로부터, 본원 발명의 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화 방법이 타 유래 줄기세포 또는 타 분화 방법을 사용하는 것보다 현저한 효과를 가지는 것이 확인되었다.

[0081] **<실시예 4> 인슐린 분비 세포로의 분화 유도 후 인슐린 유전자의 발현 확인**

[0082] 상기 실시예 2 및 비교예 2((ITS-IPC))와 비교예 3(β-mer-IPC)의 방법으로 분화 유도 후 분화된 췌장소도 세포에서 발현되는 인슐린 및 인슐린 분비 세포로의 분화 마커인 PDX1(Pancreatic and duodenal homeobox 1) 유전자의 발현 정도를 실시간 중합효소 연쇄 반응(real-time PCR) 분석을 통하여 확인하였다.

[0083] 구체적으로, real-time PCR은 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, 미국)를 총 용량 20 ul에 10 pM 프라이머 2 ul(하기 표 3), 2 ul cDNA 및 10 ul SYBR Green PCR Master Mix로 혼합하였고 50 ℃ 2분 1 사이클, 95 ℃ 10분 1 사이클, 95 ℃ 15초, 60 ℃ 30초, 72 ℃ 30초(40 사이클), 72 ℃ 10분 1 사이클로 수행하여 프로그램에 의해 계산하여 확인하였다.

[0084]

유전자	프라이머 서열 (5'-3')	서열번호
Human insulin	F: GCAGCCTTTGTGAACCAAC	1
	R: GCGGGTCTTGGGTGTGTAG	2
Human PDX1	F: GGTGGAGCTGGCTGTCAT	3
	R: AGGAGGAGGACAAGAAGCG	4
Human GAPDH	F: ACACCCACTCCTCCACCTTT	5
	R: TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	6

[0085] 상기 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 실시예 2의 방식 (ITS-IPC)분화된 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 가장 높은 인슐린 및 PDX1 유전자 발현을 나타내는 것이 확인되었다. 특히, 분화 시간적인 측면을 고려할 때, 실시예 2의 방법에 따른 분화는 비교예 3의 방법과 대비하여 짧은 시간 내에 높은 분화 효율을 보였다.

[0086] **<실시예 5> 편도 유래 줄기세포의 분화 유도 후 인슐린 분비량 변화 확인**

[0087] 상기 실시예 2(ITS-IPC) 및 비교예 3(β-mer-IPC)의 방법으로 분화 유도 후 인슐린 분비량을 측정하기 위해 세포가 배양된 플레이트의 배양액을 0.05%(w/v) BSA와 129 mM NaCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 4.7 mM KCl, 5 mM $NaHCO_3$, 2.5 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES를 넣은 인슐린 측정용 용액인 크렙스-링거 용액(Krebs-Ringer buffer; KRB 용액, pH 7.4)으로 바꾸어 주고 2시간 배양하였고, 이후 포도당 2.2 또는 25 mM의 포도당이 들어간 KRB 용액으로 바꾸어 준 후 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 1시간 후 배지를 모아서 배지에 분비된 인슐린을 인슐린 ELISA 키트(Chrystal Chem)를 사용하여 인슐린의 양을 정량하였고, 세포의 양을 보정하기 위해서 세포를 RIPA 용액(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4, protease inhibitor(Sigma aldrich))으로 분쇄한 후 단백질 양을 브래드포드 단백질 정량법(Bio-Rad)으로 정량하였다.

[0088] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 실시예 2(ITS-IPC) 방법의 인슐린 분비량이 현저히 높았으며, 외부 당농도에 반응하여 인슐린 분비량도 증가하는 외부 당농도 대비 인슐린 반응성도 실시예 2의 방법이 현저한 효과를 보였다. 즉, 분비된 인슐린 양을 고려할 때, 실시예 2의 방법에 따른 분화는 비교예 3의 방법과 대비하여 높은 인슐린 분비 세포로의 분화 효율을 보였다.

[0089] **<실시예 6> 인슐린 분비 세포로의 분화 유도 후 단백질 발현 확인**

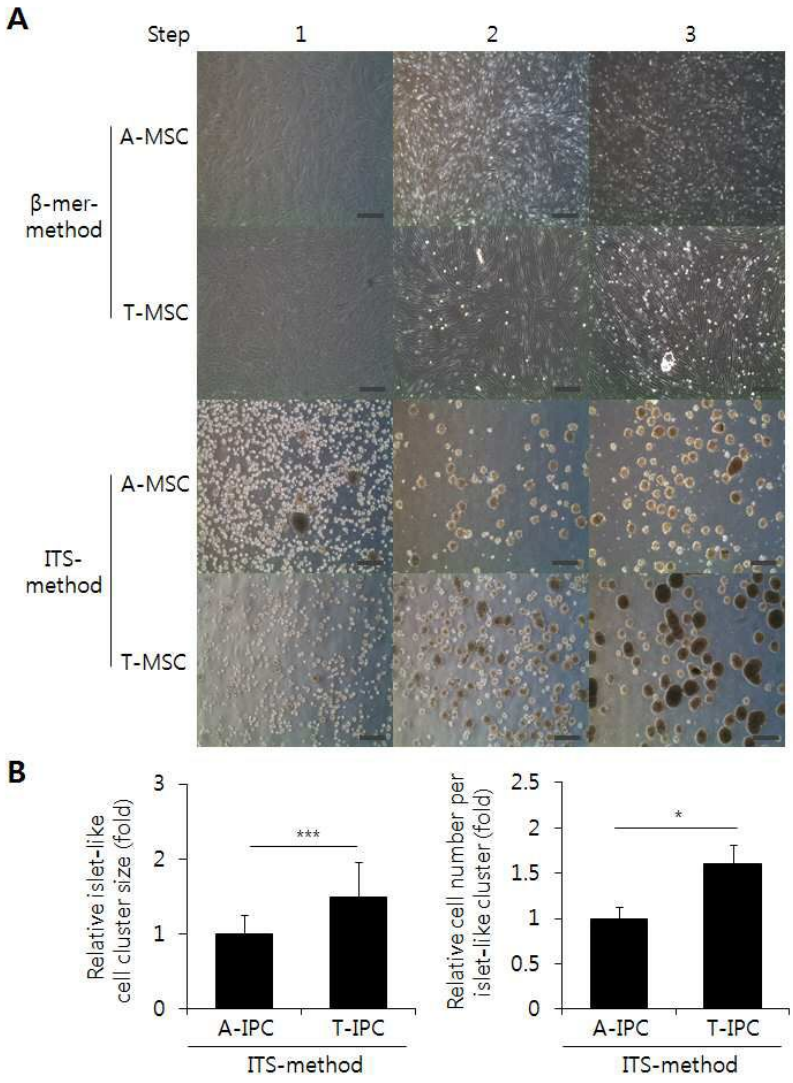
[0090] 상기 실시예 2 및 비교예 2의 방법으로 분화 유도 후 단위 단백질 당 세포가 갖고 있는 인슐린을 측정하였다.

[0091] 구체적으로, 세포를 RIPA 용액(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4, protease inhibitor(Sigma aldrich))으로 분쇄한 후 단백질 양을 브래드포드 단백질 정량법(Bio-Rad)으로 정량하고, 또한 분쇄후 세포에 포함된 인슐린은 인슐린 ELISA 키트(Chrystal Chem)를 사용하여 인슐린의 양을 정량하였다.

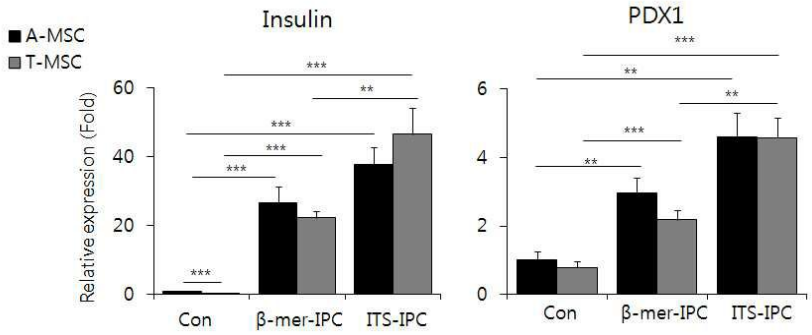
[0092] 그 결과 도 4에 나타내었다. 도 4의 A는 인슐린 총 함량을 나타내며, 도 3의 B는 단백질 발현량을 나타내며, 도 4의 C는 전체 단백질 발현량에 대한 인슐린 총 함량를 확인한 결과를 나타낸다. 같은 수의 세포 ($3X10^6$ 개)로 분화를 시작하였을 때 최종 얻어지는 인슐린 양과 단백질 양이 편도 유래 중간엽 줄기세포에서 지방 중간엽 줄기세포보다 현저히 높게 나타나는 것이 확인되었으며, 단위 단백질당 함유하고 있는 총 인슐린 역시 편도 중간엽 줄기세포가 지방 중간엽 줄기세포보다 많음을 확인하였다. 즉, 편도 유래 중간엽 줄기세포로부터 인슐린 분비 세포의 분화에 따라 지방 중간엽 줄기세포보다 세포 내 함유한 인슐린 양은 더 많은 것을 확인하였다.

도면

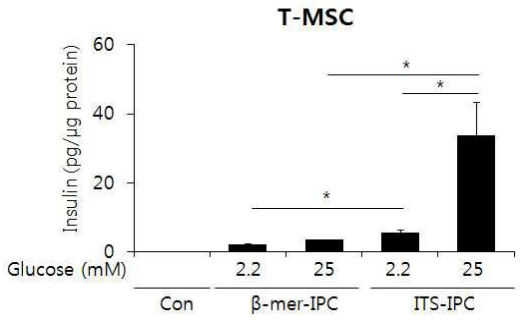
도면1


A
Step
1
2
3
A-MSC
β-mer-method
T-MSC
A-MSC
ITS-method
T-MSC
B
Relative islet-like cell cluster size (fold)
***
A-IPC
T-IPC
ITS-method
Relative cell number per islet-like cluster (fold)
*
A-IPC
T-IPC
ITS-method

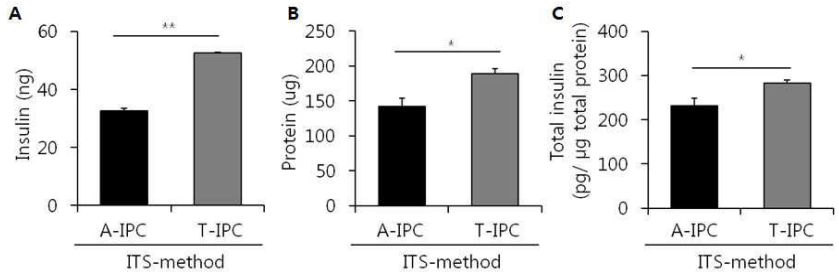
도면2


A-MSC
T-MSC
Insulin
Relative expression (Fold)
Con
β-mer-IPC
ITS-IPC
PDX1
Con
β-mer-IPC
ITS-IPC

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> A METHOD FOR DIFFERENTIATION OF TONSIL-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL INTO INSULIN SECRETORY CELLS

<130> P14-124-REA-EWHA

<150> 10-2014-0107546

<151> 2014-08-19

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human insulin forward primer

<400> 1

gcagcctttg tgaaccaac 19

<210

> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human insulin reverse primer

<400> 2

gcgggtcttg ggtgtgtag 19

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human PDX1 forward primer

<400> 3

ggtggagctg gctgtcat 18

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human PDX1 reverse primer

<400> 4

aggaggagga caagaagcg 19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GAPDH forward primer

<400> 5

acacccactc ctccaccttt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human GAPDH reverse primer

<400> 6

tgctgtagcc aaattcgttg 20