(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0047966
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0667 (2013.01)
C12N 2501/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0142381
(22) 출원일자 2017년10월30일
심사청구일자 2017년10월30일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
손영숙
서울특별시 강남구 언주로 107, 205동 703호 (개포동, 현대2차아파트)
홍현숙
서울특별시 송파구 송파대로47길 11 (석촌동, 석촌동다세대주택)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 15 항

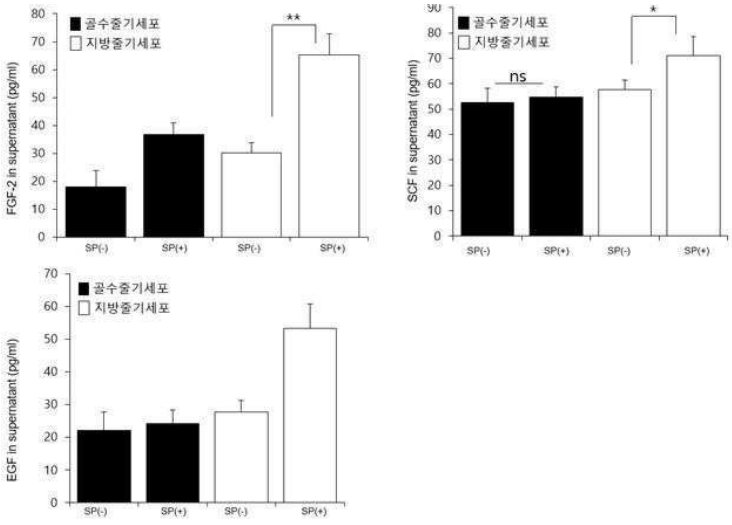
(54) 발명의 명칭 **지방 유래 줄기세포의 사이토카인 분비능 증진 방법**

(57) 요 약

본 발명은 서브스턴스 P를 유효성분으로 포함하는, ADSC (adipose-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)의 사이토카인 분비 증진용 조성물 및 이를 이용한 ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 서브스턴스 P를 이용해 제조된 ADSC의 조정 배지 (conditioned medium), 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 면역억제 또는 혈관신생용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 서브스턴스 P는 ADSC의 사이토카인 분비능을 효과적으로 증진시키는바, 서브스턴스 P와 함께 배양한 ADSC의 조정배지는 면역 억제능 증진 및 혈관신생에 우수한 효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2501/998 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 H13C1479
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술 개발/융합형산학연병 공동연구
연구과제명 줄기세포 촉진제 substance-P의 전문의약품 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희의료원
연구기간 2013.11.01 ~ 2019.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서브스턴스 P를 유효성분으로 포함하는, ADSC (adipose-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)의 사이토카인 분비 증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사이토카인은 FGF-2, SCF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인, 사이토카인 분비 증진용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 사이토카인은 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것인, 사이토카인 분비 증진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ADSC는 세포의 표면 마커 중 CD29, CD44, CD90 및 CD105가 발현되는 것인, 사이토카인 분비 증진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 서브스턴스 P를 0.01 nM 내지 500 nM 농도로 포함하는, 사이토카인 분비 증진용 조성물.

청구항 6

ADSC를 서브스턴스 P를 포함하는 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 사이토카인은 FGF-2, SCF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인, 사이토카인 분비능 증진 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 사이토카인은 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것인, 사이토카인 분비능 증진 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 ADSC는 세포의 표면 마커 중 CD29, CD44, CD90 및 CD105가 발현되는 것인, 사이토카인 분비능 증진 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 서브스턴스 P는 배양액 내에 0.01 nM 내지 500 nM 농도로 포함되는 것인, 사이토카인 분비능 증진 방법.

청구항 11

a) 서브스턴스 P를 포함하는 배지에서 ADSC를 배양하는 단계; 및

b) 상기 배양 후, 배양액을 회수하는 단계

를 포함하는, ADSC의 조정 배지 (conditioned medium) 제조 방법.

청구항 12

제11항의 제조 방법에 따라 제조된 ADSC의 조정 배지.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 조정 배지는 FGF-2, SCF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 사이토카인을 포함하는 것인, 조정 배지.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 조정 배지는 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 사이토카인을 더 포함하는 것인, 조정 배지.

청구항 15

제12항의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 면역억제 또는 혈관신생용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 서브스턴스 P를 유효성분으로 포함하는, ADSC (adipose-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)의 사이토카인 분비 증진용 조성물 및 이를 이용한 ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한, 서브스턴스 P를 이용해 제조된 ADSC의 조정 배지 (conditioned medium), 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 면역억제 또는 혈관신생용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 줄기세포는 골수, 치아 조직, 말초 혈액 등 다양한 부분에서 얻을 수 있는데, 특히 지방 조직은 다양한 잠재성을 갖는 줄기세포의 풍부한 공급원으로 알려져 있다. ADSC (adipose-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)는 관절염, 심근 경색 등 다양한 질병에 대한 치료 효과를 나타낼 수 있으며, 세포 증식 속도가 빠르고 지방 조직에서 세포를 분리하는 절차가 비교적 용이하여 환자의 부담을 줄여주는 이점이 있다.

[0004] 한편, 서브스턴스 P는 당뇨병성 궤양, 류마티스 관절염, 하지 허혈, 각막 창상 (corneal wounds) 등 다양한 질환에서 세포 증식, 항-아폽토시스 및 조직 회복에 관여하는 신경 펩타이드로서, 이러한 효과는 뉴로키닌 수용체 1 (NK-1R)을 매개로 하는 것으로 알려져 있다. 서브스턴스 P는 골수에서 줄기세포 이동을 자극하여 조직 재생을 촉진하는 것으로 알려졌으나 (Nat. Med. 15 (2009) 425-435 등), 서브스턴스 P를 활용하여 ADSC의 사이토카인 분비능을 증진시키는 방법에 관하여는 전혀 알려진 바가 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 ADSC에 적절한 자극을 주어 줄기세포의 분비능을 향상시키기 위해 예의 노력한 결과, ADSC에 서브스턴스 P를 처리함으로써 줄기세포의 사이토카인 분비능이 개선되고, 이로 인해 면역 조절 기능 및 혈관신생 촉진능이 향상되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 서브스턴스 P를 유효성분으로 포함하는, ADSC (adipose-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)의 사이토카인 분비 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 ADSC를 서브스턴스 P를 포함하는 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명은 또 다른 목적은 서브스턴스 P를 포함하는 배지에서 ADSC를 배양하는 단계; 및 상기 배양 후, 배양액을 회수하는 단계를 포함하는, ADSC의 조정 배지 (conditioned medium) 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 ADSC의 조정 배지 제조 방법에 따라 제조된 ADSC의 조정 배지, 또는 이를 유효성분으로 포함하는 면역억제 또는 혈관신생용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각에 대한 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0011] 본 발명의 하나의 양태는 서브스턴스 P (substance P)를 유효성분으로 포함하는, ADSC (adipose-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)의 사이토카인 분비 증진용 조성물이다.

[0012] 본 발명자들은 서브스턴스 P를 포함하는 본 발명의 사이토카인 분비 증진용 조성물이 ADSC에서 다양한 사이토카인의 분비를 향상시킴으로써, ADSC 및 이의 조정 배지의 치료제로서의 활용을 극대화할 수 있음을 최초로 규명하였다.

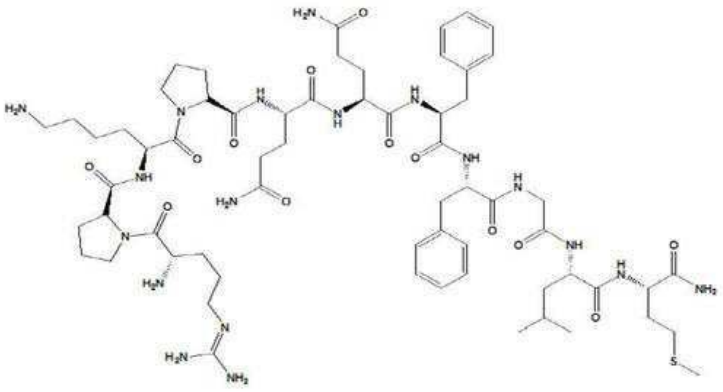
[0013] 본 발명에서, “서브스턴스 P”는 11개의 아미노산 서열 (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met; 서열번호 1)을 포함하는 펩티드 또는 이의 펩티드 유사체를 의미한다. 서브스턴스 P는 포유류의 타키키닌 (tachykinin)인 신경펩티드로서, 뉴로키닌 수용체 1 (NK-1R)의 리간드로 작용할 수 있고, 뇌척수 등 중추 신경계뿐만 아니라 장관 등의 말초에 널리 분포하여 1차 지각신경에서의 통각의 전달 물질로 알려져 있다. 그러나, 서브스턴스 P가 ADSC의 사이토카인 분비에 미치는 영향은 현재까지 보고된 바 없다.

[0014] 본 발명에서 "펩티드 유사체"는 부모 펩티드, 즉 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 펩티드의 구조적 또는 기능적 파생물로서, ADSC의 사이토카인 분비능을 증진시키는 것을 의미한다. 펩티드 유사체는 부모 펩티드의 모든 특성을 나타낼 필요는 없으며, 일부 경우, 부모 펩티드와 비교하여 적어도 하나의 변경된 특성을 가질 수 있다. 펩티드 유사체는 서열번호 1의 아미노산 서열에 적어도 8개, 9개 또는 10개의 서열 상동성을 가지며, 아미노산의 교체, 치환, 결손 및/또는 삽입에 의해 생성될 수 있다. 치환이나 삽입은 일반적으로 자연적으로 발생하는 아미노산을 포함하지만, 합성된 아미노산이나 비정상적인 아미노산도 포함할 수 있다. 펩티드 유사체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩티드의 하나 이상의 생물학적인 활성을 유지한다. 예컨대, 상기 펩티드 유사체는 뉴로키닌 수용체 1 (NK-1R)의 리간드로서 작용할 수 있다.

[0015] 또한, 펩티드 유사체는 전달 및 안정성 등을 위해 필요에 따라 천연 또는 합성 관능기를 도입하여 화학적으로 개질한 것일 수 있다. 예컨대, 펩티드 유사체는 PEG와 같은 올리고글리신 유도체화 중합체, 형광단, 비타민, 지질, 탄수화물, 핵산, 기타 펩티드 또는 단백질을 공유 결합시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 일례로 본 발명에서, 서브스턴스 P는 서열번호 1의 아미노산을 갖는 펩티드의 C-말단이 아민화된 하기 화학식 1의 화합물일 수 있다:

[0017] <화학식 1>



[0018]

[0019] 본 발명에서, "ADSC (adipocyte-derived stem cell; 지방 유래 줄기세포)"는 지방조직으로부터 분리된 줄기세포를 의미하며, 지방, 골, 연골, 근섬유 등 하나 이상의 중간엽 세포로 분화할 수 있는 세포를 모두 포함할 수 있다. 본 발명에서, ADSC는 지방전구세포, 기질세포, 다분화능 지방 유래 세포 (multipotent adipose-derived

cells) 또는 지방 유래 성체 줄기세포 (adipose derived adult stem cells)의 개념을 모두 포함한다. 상기 ADSC는 인간에게 이식할 수 있는 돼지, 소, 영장류 및 인간 등을 포함하는 포유류 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 상기 ADSC는 세포의 표면 마커 중 CD29, CD44, CD90 및 CD105가 발현되되고, CD34 및 CD45가 발현되지 않는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명에서, "사이토카인 (cytokine)"은 다양한 세포에서 분비되는 저분자량의 세포-신호전달 단백질 분자로서, 세포 간 신호전달에 널리 쓰이는 신호전달 분자를 총칭한다. 사이토카인은 단백질, 펩타이드 또는 당단백질일 수 있으며, 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자 (tumor necrosis factor) 등 다양한 발생학상 기원의 세포에 의해 전 인체를 통해 생산되는 크고 다양한 패밀리의 조절인자를 모두 포함한다. 사이토카인은 예컨대 감염, 면역 반응, 염증, 트라우마, 패혈증, 암 및 생식 등의 숙주 반응에서 중요한 역할을 담당한다.

[0022] 또한, 본 발명에서 사이토카인은 성장인자를 포함할 수 있다. 본 발명에서 "성장인자 (growth factor)"는 세포 성장, 증식 및 분화를 촉진시킬 수 있는 자연적으로 생성되는 물질을 의미한다. 성장인자는 세포 사이의 신호전달 분자로서의 역할을 하며, 성장인자의 종류에 따라 분화 및 발달을 촉진할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 서브스턴스 P의 처리에 의하여 ADSC에서 분비능이 증진되는 사이토카인은 예컨대, FGF-2, SCF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 사이토카인일 수 있고, 추가적으로 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 구체적 일 실시예에서, 체외 배양한 후기 계대의 ADSC는 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α 등의 사이토카인 분비 수준이 전기 계대에 비해 감소되었으나, 서브스턴스 P를 처리할 경우 사이토카인 분비량이 회복되는 것을 확인하였다 (도 2의 A-F). 또한, 줄기세포 유래가 상이한 BM-MSC에 서브스턴스 P를 처리할 경우에는 분비량에 변화가 없거나 변화가 미미하였던 FGF-2, SCF 및 EGF 등의 사이토카인도, ADSC에 서브스턴스 P를 처리할 경우에는 그의 분비 수준을 현저히 증진시킨다는 점을 확인하였다 (도 3). 따라서, 서브스턴스 P는 ADSC에서 사이토카인 분비를 증진시키는 효과가 우수하다.

[0025] 본 발명의 서브스턴스 P를 유효성분으로 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비 증진용 조성물에서, 서브스턴스 P는 ADSC와 함께 배양될 때 ADSC의 사이토카인 분비능을 증진시키는 것이라면 어떤 농도로도 함유될 수 있다. 예컨대, 상기 사이토카인 분비 증진용 조성물에 서브스턴스 P는 0.01 nM 내지 500 nM, 또는 0.1 nM 내지 200 nM, 또는 1 nM 내지 100 nM로 함유될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 다른 하나의 양태는 ADSC를 서브스턴스 P를 포함하는 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법이다.

[0027] 본 발명의 ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법에서, 서브스턴스 P, ADSC 및 사이토카인의 의미는 앞서 설명한 바와 같다.

[0028] 본 발명에 따른 ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법은 체외 (ex vivo)에서 수행되거나 또는 시험관 내 (in vitro)에서 수행될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에서 ADSC 배양시 서브스턴스 P는 ADSC 배양 개시 전 배지에 선처리될 수 있으며, ADSC 배양 중에 처리될 수도 있다. 서브스턴스 P의 처리 횟수는 배양 계대수 증가에 따라 적절하게 조절될 수 있으며, 1회 처리될 수 있고, 2회 이상 수회 처리될 수도 있다.

[0030] 배양에 이용되는 배양 용기 및 배양 배지는 ADSC가 증식할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않고, 통상의 기술자는 그 목적에 따라 적합한 배양 용기 및 배양 배지를 선택하여 사용할 수 있다. 상기 배양 배지는 ADSC의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 예컨대, 상기 배양 배지는 세포 배양 최소 배지 (cell culture minimum medium; CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 세포 배양 최소 배지는 예컨대, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal essential Medium), α-MEM(α Minimal essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, GMEM (Glasgows Minimal essential Medium) 및 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 배양 배지에는 ADSC의 증식을 촉진시키거나 사이토카인 분비를 더욱 촉진시키기 위해 추가적인 사이토카인 또는 화합물 등이 포함될 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 ADSC의 사이토카인 분비능 증진 방법을 위해, ADSC를 계대하여 사용할 수 있다. 배양 중 ADSC를

계대함으로써 배양 조건을 개선하고, ADSC를 대량으로 생산할 수 있다. ADSC의 계대 방법은 특별히 한정되지 않고, 종래 공지된 ADSC의 계대 방법을 이용하여 계대할 수 있다. 특히, ADSC는 계대 수가 증가함에 따라 사이토카인 분비능이 크게 감소하는데, 본 발명의 배양 방법은 계대수 증가에 따른 사이토카인 분비량 감소를 억제하여, 계대수 증가에 따른 ADSC의 성질 변화를 최소화하고 인체 적용에 적합한 ADSC를 제공할 수 있다.

[0032] 본 발명의 배양 방법을 전기 계대로 예컨대 제1계대, 제2계대 또는 제3계대에 사용할 수 있고, 후기 계대로 예컨대 제4계대, 제5계대, 제6계대, 제7계대, 제8계대, 제9계대, 제10계대, 제11계대, 제12계대에 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 a) 서브스턴스 P를 포함하는 배지에서 ADSC를 배양하는 단계; 및 b) 상기 배양 후, 그 배양액을 회수하는 단계를 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비능 증진용 조정 배지 (conditioned medium)의 제조 방법이다.

[0034] 본 발명의 ADSC의 사이토카인 분비능 증진용 조정 배지의 제조 방법에서, 서브스턴스 P, ADSC 및 사이토카인의 의미는 앞서 설명한 바와 같다.

[0035] 본 발명에서, "조정 배지"는 체외 또는 시험관 내에서 분리된 줄기세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지에 줄기세포를 일정 기간 배양한 후 세포를 제거하고 남은 용액을 의미하며, 사이토카인과 같이 배양 기간 동안 세포로부터 분비된 물질 뿐만 아니라, 세포 배양시 소모되고 남은 영양성분 등도 모두 포함한다.

[0036] 본 발명에 따라 제조된 조정 배지는 높은 수준의 사이토카인 분비량을 함유할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따라 제조된 조정 배지는 높은 수준의 FGF-2, SCF 및 EGF로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 사이토카인을 포함할 수 있고, TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 사이토카인을 더 포함할 수 있으나 이제 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명에서, "회수"는 ADSC를 배양한 배양 배지로부터 세포를 제외한 배양액을 추출, 채취, 단리 또는 정제시키는 것을 의미한다. 배양액을 회수하는 방법은 본 발명의 관련 기술분야에 공지된 통상적인 회수 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 a) 서브스턴스 P를 포함하는 배지에서 ADSC를 배양하는 단계; 및 b) 상기 배양 후, 그 배양액을 회수하는 단계를 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비능 증진용 조정 배지의 제조 방법에 따라 제조된 조정 배지이다.

[0039] 본 발명의 ADSC의 사이토카인 분비능 증진용 조정 배지의 제조 방법에 따라 제조된 조정 배지에서, 서브스턴스 P, ADSC, 사이토카인, 조정 배지 및 회수의 의미는 앞서 설명한 바와 같다.

[0040] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 a) 서브스턴스 P를 포함하는 배지에서 ADSC를 배양하는 단계; 및 b) 상기 배양 후, 그 배양액을 회수하는 단계를 포함하는, ADSC의 사이토카인 분비능 증진용 조정 배지의 제조 방법에 따라 제조된 조정 배지를 유효성분으로 포함하는, 면역억제 또는 혈관신생용 조성물이다.

[0041] 본 발명의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 면역억제 또는 혈관신생용 조성물에서, 서브스턴스 P, ADSC, 사이토카인, 조정 배지 및 회수의 의미는 앞서 설명한 바와 같다.

[0042] 본 발명에서 “면역억제”란 면역 반응을 제어하거나 억제하는 데 도움을 주는 억제성 신호를 제공하는 것으로, 면역 자극을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 면역 활성을 저하, 방지, 또는 지연시키나, 또는 항원 제시, T 세포 활성화, T 세포 분화, T 세포 기능 발현, 시토카인 분비 또는 생산, 및 표적 세포 용해 등을 감소시키는 것을 유도하는 기능을 의미한다.

[0043] 본 발명의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물은 다양한 자가면역질환 또는 염증성 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 상기 자가면역질환 또는 염증성 질환은 류마티스 관절염, 천식, 피부염, 건선, 낭섬유증, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선, 다발성근염, 경피증, 애디슨병, 백반증, 악성빈혈, 사구체신염, 폐섬유증, 염증성장질환, 궤양성 대장염, 자가면역성 당뇨, 당뇨 망막증, 비염, 혀혈-재관류 손상, 혈관성형술후 재협착, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary diseases; COPD), 그레이브병, 위장관 알러지, 결막염, 죽상경화증, 관상동맥질환, 협심증 또는 소동맥 질환 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 구체적 일 실시예에서, 서브스턴스 P가 포함된 배지로 배양된 ADSC에서 수득한 조정 배지가 염증 또는 비염증 환경에서 T 세포의 생존력을 효과적으로 감소시켰을 뿐만 아니라 (도 4의 B 및 C), T 세포의 IL-2 분

비를 효과적으로 억제한다는 점을 확인하였다 (도 4의 D). 따라서, 본 발명의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물은 우수한 면역억제 활성을 나타내어 면역억제제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 "혈관신생"이란 혈관이 새로 형성되는 과정, 즉 새로운 혈관이 세포, 조직 또는 기관 내로 발생 및 분화하는 것을 의미한다. 본 발명의 혈관신생은 내피세포 활성화, 이동, 증식, 매트릭스 재형성 및 세포 안정화를 비롯한 혈관 형성 과정에 관련된 혈관재생, 혈관회복 및 혈관 분화를 포함한다.

[0046] 본 발명의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 혈관신생용 조성물은 혈관 재생, 회복 및 분화가 필요한 다양한 질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 상기 질환은 재관류 손상, 허혈성 궤양, 허혈성 심장 질환, 허혈성 심근 경색, 하지 허혈 질환, 협심증, 뇌졸중 또는 뇌경색 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명의 구체적 일 실시예에서, 서브스턴스 P가 포함된 배지로 배양된 ADSC에서 수득한 조정 배지가 TNF-α의 존재 또는 부재 하에서 모두 HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell; 인간 제대 정맥 내피 세포)의 생존력을 효과적으로 증진시켰을 뿐만 아니라 (도 4의 E 및 F), HUVEC의 튜브 형성 능력을 효과적으로 향상시킨다는 점을 확인하였다 (도 4의 G). 따라서, 본 발명의 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 혈관신생용 조성물은 우수한 혈관신생 활성을 나타내어 혈관신생 관련 질환의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0050] 본 발명에 따르면, 서브스턴스 P는 ADSC의 사이토카인 분비능을 효과적으로 증진시키는바, 서브스턴스 P와 함께 배양한 ADSC 및 이의 조정배지는 면역 억제능 증진 및 혈관신생에 우수한 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 ADSC의 배양 계대수 증가에 따른 증식능 억제 효과 감소를 집단 배가 시간 (population doubling time; PDT) 및 세포 수 증가 수준을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 ADSC에서 서브스턴스 P 처리에 따른 사이토카인 분비 증가 효과를 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α 분비량 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 ADSC에서 서브스턴스 P 처리에 따른 사이토카인 분비 증가 효과를 FGF-2, SCF 및 EGF 분비량 측정을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 서브스턴스 P 처리된 ADSC의 조건 배지의 T 세포 활성 감소 및 혈관 신생 촉진 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0053] **<실시예 1> 실험 재료 준비**

[0054] 서브스턴스 P-아세테이트 염은 Sigma-Aldrich (ST. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. α-MEM 배지, 페니실린/스트렙토마이신 및 0.25% 트립신 EDTA 용액은 Welgene (Daegu, Korea)으로부터 입수하였다. CP-96344는 TOCRIS (Bristol, UK)로부터, SB-505124는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터, 엑시티닙 (Axitinib)은 Tocris (Bristol, UK)로부터, 그리고 AMD3100은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)로부터 입수하였다. 인간 T 세포주 Jurkat는 ATCC로부터 구입하였다. 인간 TGF-β1 및 VEGF ELISA 키트는 R&D Systems (Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. 건강한 ADSC (adipose-derived stem cell; ADSC)는 Boramae Medical Center (IRB# 2016-0113/16-2016-3/021)로부터 입수하였다.

[0055] **<실시예 2> 후기 계대 ADSC의 증식 촉진에 대한 서브스턴스 P의 효과**

[0056] 후기 계대 ADSC의 노화에 대한 서브스턴스 P의 효과를 확인하기 위해 ADSC의 증식능을 측정하였다.

[0057] 먼저, 피하 지방 조직을 채취하여 PBS로 2회 세척하고 37 ℃에서 1 시간 동안 콜라게나아제 (GMP grade, Vivagen, Los Angeles, CA)로 처리하였다. 적혈구 및 잔해를 세포 여과기 (SPL Life, Pocheon, Korea)로 제거하였다. 혈관 분획을 10% FBS가 보충된 α-MEM에 37 ℃, 5% CO_2 조건에서 분주하였다. ADSC를 2 계대에서 6 계대까지 배양하고, 각 계대에서 세포 증식 속도를 분석 하였다. 또한 각 계대에서 최종 세포 수를 세고, 세포 수의 배수 증가에 기초하여 집단 배가 시간 (population doubling time; PDT)을 구하였다.

[0058] 그 결과, 2, 3 및 4 계대에서 ADSC는 유사한 PDT를 보였으나, PDT는 5 계대에서 약간 증가하였고, 6 계대는 4 계대보다 23.1% 증가하였다 (2 계대에서 25.45 시간, 3 계대에서 26.27 시간, 4 계대에서 26.13 시간, 5 계대에서 28.67 시간, 6 계대에서 32.37 시간) (도 1의 A).

[0059] 한편, 서브스턴스 P를 6 계대 ADSC에 매일 100 nM의 용량으로 첨가하였다. 또 다른 실험군에 대해서 서브스턴스 P 처리 5분 전에 NK-1R 길항제인 CP (CP96345)를 처리하였다. 세포 밀도가 충만 (confluent)해질 때 계대 배양을 수행하고 총 세포 수를 세었다.

[0060] 그 결과, 서브스턴스 P 처리는 PBS 처리보다 총 세포 수를 41% 증가시켰다 (도 1의 B). 초기 플레이팅된 세포 수와 비교하여, PBS 처리된 ADSC는 그 수가 7.4배 증가한 반면, 서브스턴스 P 처리된 ADSC는 10.4배로 현저히 증가하였다. 그러나, 서브스턴스 P 처리에 앞서 CP96345를 처리할 경우 세포 수는 8.6배 증가하는 데 그쳤다 (도 1의 C).

[0061] 위 결과를 종합하면, 서브스턴스 P는 후기 계대의 ADSC의 세포 증식 능력의 손상을 회복시키는 효과가 우수함을 알 수 있다.

[0062] **<실시예 3> 장기간 배양에 따른 ADSC의 사이토카인 생산능 감소에 대한 서브스턴스 P의 효과**

[0063] 서브스턴스 P가 후기 계대 ADSC의 사이토카인 분비능을 증진시키는지 확인하기 위해, ADSC의 배양 배지 내의 사이토카인 농도를 측정하였다.

[0064] 실험을 위해, 서브스턴스 P를 처리한 6 계대 ADSC의 배양액 및 서브스턴스 P 처리에 앞서 CP96345를 처리한 6 계대 ADSC의 배양액을 준비하였고, 대조군으로 PBS를 처리한 2 계대 및 6 계대 ADSC의 배양액을 각각 준비하였다.

[0065] 그 다음, 조건 배지 내 TGF-β1, VEGF 및 SDF-1α의 농도를 ELISA 키트를 사용하여 제조자의 지시에 따라 정량화하였다. 구체적으로, 표준물질 및 샘플을 항 TGF-β1, VEGF 또는 SDF-1α 항체로 코팅된 96-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후, HRP (horseradish peroxidase)가 컨쥬게이트된 2차 항체를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2 시간 동안 다시 배양하였다. 세척액으로 3회 세척하고 기질 용액 100 ml를 첨가한 다음, 정지 용액 100 ml를 첨가하였다. OD는 EMax Endpoint ELISA 마이크로플레이트리더를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0066] 그 결과, ADSC에서 분비되는 면역 억제 인자인 TGF-β1의 분비는 초기 계대보다 6 계대에서 더 낮았지만, 서브스턴스 P를 처리한 경우 6 계대의 ADSC에서 TGF-β1 분비가 초기 계대 수준으로 회복되었다 (도 2의 A). TGF-β1의 생산을 1×10^4 세포 당 TGF-β1의 양으로 계산한 결과, 세포 당 TGF-β1 분비량이 증가한 것이 확인되었다 (도 2의 B). 즉, 단순히 세포 수가 증가한 것이 아니라 세포 당 TGF-β1의 분비량이 증가하여 전체 TGF-β1 분비량이 증가한 것임을 알 수 있다. 이와 같은 TGF-β1 분비에 대한 서브스턴스 P의 효과는 NK-1R 길항제인 CP96344 전처리에 의해 완전히 억제되었다.

[0067] VEGF 및 SDF-1α는 내피 세포의 생존, 이동 및 증식에 필수적이다. TGF-β1의 경우와 마찬가지로, VEGF 및 SDF-1α의 분비량은 계대수가 증가함에 따라 감소하였으나, 서브스턴스 P를 처리한 경우 6 계대의 ADSC에서의 VEGF (도 2의 C) 및 SDF-1α (도 2의 E)의 분비는 초기 계대 ADSC에서와 비슷한 수준으로 회복되었으며, 1×10^4 세포 당 VEGF (도 2의 D) 및 SDF-1α (도 2의 F)의 분비량이 증가한 것으로 확인되었다. 또한, 상기 가용성 인자의 분비에 대한 서브스턴스 P의 효과는 NK-1R 길항제인 CP96344 전처리에 의해 완전히 억제되었다.

[0068] 위 결과를 종합하면, 서브스턴스 P는 후기 계대의 ADSC의 사이토카인 분비능을 증진시키는 효과가 우수한 것을 알 수 있다.

[0069] **<실시예 4> 줄기세포 유래에 따른 서브스턴스 P의 사이토카인 분비능 증진 효과**

[0070] 줄기세포의 유래에 따른 서브스턴스 P 처리의 효과를 확인하기 위해, 실시예 3에 개시된 것과 같은 방식으로 BM-MSC (bone marrow-mesenchymal stem cell; 골수 유래 중간엽 줄기세포)와 ADSC의 FGF-2, SCF 및 EGF의 분비량을 측정하였다.

[0071] 그 결과, 서브스턴스 P 처리시 후기 계대의 골수 유래 중간엽 줄기세포 및 ADSC 모두에서 FGF-2의 분비가 증진되었으나, ADSC의 분비량 증진 효과가 현저히 우수하였다. 또한, 골수 유래 중간엽 줄기 세포의 경우, 서브스턴스 P 처리 후 SCF 및 EGF의 분비량에는 유의한 변화가 없었으나, ADSC의 경우 SCF 및 EGF의 분비 모두 증진되는 것을 확인하였다 (도 3).

[0072] 즉, BM-MSC에서도 서브스턴스 P가 사이토카인 분비능을 다소 향상시키나, ADSC에서 사이토카인 분비 증가 효과가 더 우수하고, BM-MSC에서 분비량이 증가하지 않는 SCF 및 EGF 등의 사이토카인의 분비가 ADSC에서 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0073] **<실시예 5> 서브스턴스 P에 의해 유도되는 사이토카인 분비의 효과**

[0074] 서브스턴스 P에 의한 사이토카인 분비능 증진이 특정 세포 유형의 활동에 영향을 줄 수 있는지 평가하기 위해, ADSC의 조건배지의 면역 조절능 및 신생혈관 생성능을 측정하였다.

[0075] 면역 조절 기능 확인

[0076] 서브스턴스 P 처리 ADSC 조건 배지 ($ADSC^{SP-CM}$) 제조를 위해, T75 플라스크에 4×10^5 ADSC를 분주한 다음, 4 시간 후 서브스턴스 P (최종 100 nM)를 첨가하고 그 후 매일 첨가하였다. TGF-β1 신호 전달이 차단된 서브스턴스 P 처리 ADSC 조건 배지 제조를 위해, SB-505124를 $ADSC^{SP-CM}$ 첨가 30 분 전에 처리하였다. 대조군으로 사용된 ADSC 조건 배지 ($ADSC^{CM}$)에는 서브스턴스 P 대신 PBS를 사용하였다.

[0077] 또한, CD4 + Jurkat leukemic T 세포를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY)에서 37 ℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 그 다음, T 세포를 24 시간 동안 LPS (1 ㎍/㎖, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)의 존재 또는 부재 하에 ADSC 조건 배지 ($ADSC^{CM}$) 또는 서브스턴스 P 처리 ADSC 조건 배지 ($ADSC^{SP-CM}$)에서 배양하였다. 그 후, 세포 생존력 분석을 위해 WST-1 분석을 실시하였다.

[0078] 그 결과, $ADSC^{CM}$은 T 세포 생존력을 감소시켰고, 이러한 효과는 $ADSC^{SP-CM}$에 의해 강화되었음을 확인하였다 (도 4의 B). 염증 환경을 모방하기 위해 LPS를 처리한 경우에도, 서브스턴스 P 처리가 ADSC-매개 T 세포 억제를 촉진한다는 것을 확인하였다 (도 4의 C). 한편, TGF-β 카나아제 억제제인 SB-505124에 의한 TGF-β1 신호 전달의 차단은 T 세포의 생존력에 대한 $ADSC^{SP-CM}$의 영향력을 소멸시켰으며, 이에 $ADSC^{CM}$을 처리한 경우와 유사한 수준을 유지하였음을 확인하였다 (도 4의 B 및 C).

[0079] 한편, T 세포의 성장, 분화 및 생존은 IL-2 신호에 의해 매개되며, TGF-β1은 IL-2 발현의 억제를 유도하여 T 세포 증식 억제를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이에, 상기 실험 조건에서 배양한 Jurkat T 세포 배양액에서 IL-2 생성 수준을 ELISA를 통해 측정하였다.

[0080] 그 결과, $ADSC^{CM}$을 첨가한 경우 T 세포의 IL-2 분비가 감소하였고, $ADSC^{SP-CM}$에 의해 이러한 효과가 촉진되었음을 확인하였다 (도 4의 D). 한편, TGF-β 카나아제 억제제인 SB-505124에 의한 TGF-β1 신호 전달의 차단은 IL-2 생성에 대한 $ADSC^{SP-CM}$의 영향력을 소멸시켰으며, 이에 $ADSC^{CM}$을 처리한 경우와 유사한 수준을 유지하였음을 확인하였다 (도 4의 D).

[0081] 위 결과를 종합하면, 서브스턴스 P가 ADSC에서 TGF-β1 등의 사이토카인 분비를 촉진함으로써 ADSC의 면역 억제능을 증진시키며, 이는 TGF-β1의 분비 증진 등에 의해 매개된 IL-2의 분비 억제를 통해 발생한다는 점을 알 수 있다.

[0082] 혈관신생능 확인

[0083] in vitro에서 ADSC의 혈관 신생 가능성을 확인하기 위하여, HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell; 인간 제대 정맥 내피 세포)을 대상으로 세포 생존력을 측정하였다.

[0084] HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell; 인간 제대 정맥 내피 세포) (Lonza, Basel, Switzerland)을 EGM-2 (Lonza, Basel, Switzerland)에서 24 시간 동안 TNF-α (20 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN)의 존재 또는 부재 하에 $ADSC^{CM}$ 또는 $ADSC^{SP-CM}$에서 배양하였다. $ADSC^{CM}$ 또는 $ADSC^{SP-CM}$을 T 세포 배양물 또는 HUVEC 배양 배지에 1:1 비율로 첨가 하였다. $ADSC^{SP-CM}$에 의해 매개되는 VEGF 및 SDF-1α 신호 전달을 차단하기 위하여, 엑시티닙 및 AMD3100을 $ADSC^{SP-CM}$ 첨가 30 분 전에 전처리하였다.

[0085] 상기 배양된 세포에 WST-1 용액을 첨가하고 2.5 시간 동안 배양하였다. OD (optical density)는 450 nm의 파장에서 EMax Endpoint ELISA 마이크로플레이트리더 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 측정하였다. α-MEM으로 처리된 T 세포 또는 HUVEC의 활성을 10 %로 설정하고, 조건 배지에서의 T 세포/HUVEC 활성을 대조군의 활성에 대한 백분율로 나타내었다.

[0086] 그 결과, $ADSC^{CM}$은 TNF-α의 부재 (도 4의 E) 및 존재 (도 4의 F) 하에서 모두 HUVEC의 세포 생존 능력을 향상시켰으며, $ADSC^{SP-CM}$ 처리는 이를 더욱 강화하였음을 확인하였다. 한편, VEGF 또는 SDF-1α 신호 전달을 차단하기 위해 엑시티닙 또는 AMD3100을 전처리한 경우, 엑시티닙 처리군에서 HUVEC의 세포 생존 능력 향상 효과가 반감되었으나, AMD3100 처리군에서는 HUVEC의 세포 생존 능력에 거의 영향을 미치지 않음을 확인하였다 (도 4의 E 및 F).

[0087] 다음으로, ADSC의 혈관 신생능을 확인하기 위해, ADSC 조건 배지에 의한 HUVEC의 튜브 형성을 관찰하였다. 구체적으로 48 웰-플레이트에 마트리겔 (Matrigel) (BD, San Jose, CA, USA)을 도포하고 37 ℃에서 30 분간 배양하였다. HUVEC을 엑시티닙과 함께 $ADSC^{CM}$ 또는 $ADSC^{SP-CM}$에서 매트리겔(Matrigel) 매트릭스 상에서 37 ℃에서 4 시간 동안 배양하였다. 튜브 구조를 위상차 현미경 하에서 관찰하였다.

[0088] 그 결과, 모든 조건에서 튜브 형성이 검출되었으며, $ADSC^{CM}$ 처리된 HUVEC과 비교하여 특히 $ADSC^{SP-CM}$ 처리된 HUVEC은 보다 조밀한 구조를 보였다 (도 4의 G). 한편, VEGF 억제제인 엑시티닙 또는 SDF-1α 신호를 차단하는 AMD3100을 처리할 경우 모두 $ADSC^{SP-CM}$으로 유도된 HUVEC의 튜브 형성 능력을 억제시켜, $ADSC^{CM}$ 처리된 HUVEC과 유사한 수준을 보여주었다 (도 4의 G).

[0089] 위 결과를 종합하면, 서브스턴스 P에 의해 VEGF 및 SDF-1α와 같은 사이토카인 분비가 증진된 ADSC의 배양액은 혈관 내피세포 생존 및 혈관신생능을 증진시키는 효과를 나타내며, 여기서 VEGF는 세포 생존 및 이동 모두에 관여하는 반면, SDF-1α는 세포 이동에 관여할 수 있음을 알 수 있다.

[0090] 본 실시예의 결과를 종합하면, 서브스턴스 P가 사이토카인 분비능 증진을 통해 ADSC의 파라크린 잠재력을 조절함으로써 장기간 배양 후에도 ADSC-매개 조직 회복을 도울 수 있음을 알 수 있다.

[0091] **<실시예 6> ADSC 특이적 마커의 세포 노화 지표로의 이용 가능성 여부**

[0092] ADSC 특이적 마커의 발현은 주로 ADSC 여부를 확인하기 위해 사용된다. 이를 위해 분리 직후 또는 장기간 배양 후 특정 마커에 대한 FACS (fluorescence-activated cell sorting) 분석을 수행하였다. 구체적으로, FACS 칼리버 (Calibur) 유동 세포 계측기 및 CELLQuest 소프트웨어 (Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용해 CD45, CD34, CD29, CD105, CD44 및 CD90의 발현을 분석하여 ADSC 여부를 확인하였다.

[0093] 그 결과, ADSC가 장기간 배양에 의해 증식 및 파라크린 잠재력이 손상되었음에도 불구하고, ADSC 특이적 마커의 발현이 보존되었음을 확인하였다 (표 1). 또한, 서브스턴스 P 처리는 ADSC 특이적 마커의 발현 수준에 영향을 미치지 않았다.

[0094] 이러한 결과는 CD45, CD29, CD105, CD34, CD44 및 CD90을 포함하는 특정 마커의 발현은 세포 노화의 주요 지표로 사용될 수 없으며, 줄기세포의 노화를 확인하기 위해서는 파라크린 인자를 이용한 기능 분석을 사용해야함을 의미한다.

표 1

[0095]

계대 수	발현률 (%)		
	P2	P6	P6
	SP (-)	SP (-)	SP (+)
CD45	1.80±0.01	1.10±0.04	0.90±0.02

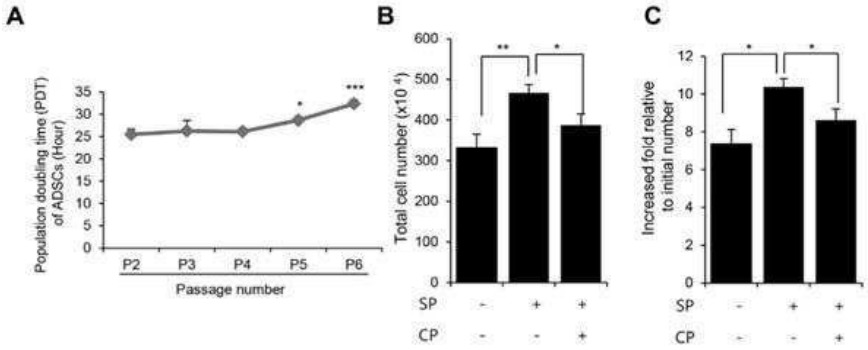
CD29	90.7±0.80	92.4±0.20	94.5±0.70
CD105	80.8±0.90	89.4±0.02	88.3±0.12
CD34	1.20±0.03	0.80±0.04	0.94±0.10
CD44	92.1±2.40	96.4±0.50	95.4±1.20
CD90	79.5±2.50	82.3±0.70	80.7±0.60

[0096] 상기 실시예들을 통해, 본 발명에 따른 서브스턴스 P를 포함하는 ADSC의 사이토카인 분비 증진용 조성물은 후기 계대의 ADSC 세포 증식 속도 및 집단 배가 시간 (population doubling time; PDT)을 초기 계대 수준으로 유지시키고 (도 1), TGF-β1, VEGF, SDF-1α, FGF-2, SCF 및 EGF의 분비를 증진시켰으며 (도 2 및 도 3), 이러한 사이토카인 분비 증진능은 골수 유래 중간엽 줄기세포와 비교해볼 때에도 현저히 우수함을 확인하였다 (도 3). 또한, 본 발명에 따라 서브스턴스 P를 ADSC에 가하여 배양하여 얻은 조건 배지는 T 세포의 생존력 및 IL-2 분비능을 효과적으로 억제하는 면역 억제능 뿐만 아니라 HUVEC 세포의 튜브 형성을 촉진하는 혈관신생능이 우수함을 확인하였다 (도 4).

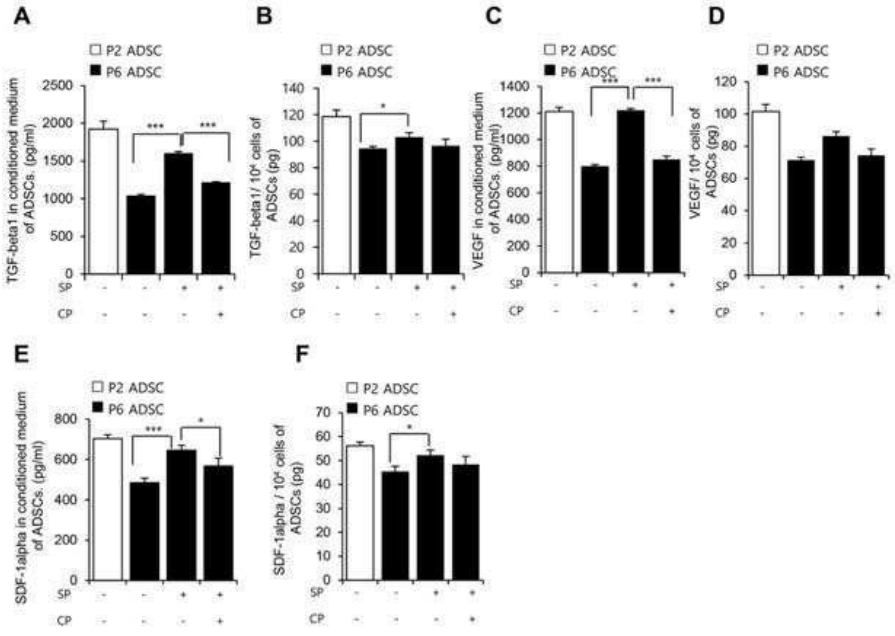
[0097] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 관련 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구범위와 그의 등가물에 의하여 정의될 것이다.

도면

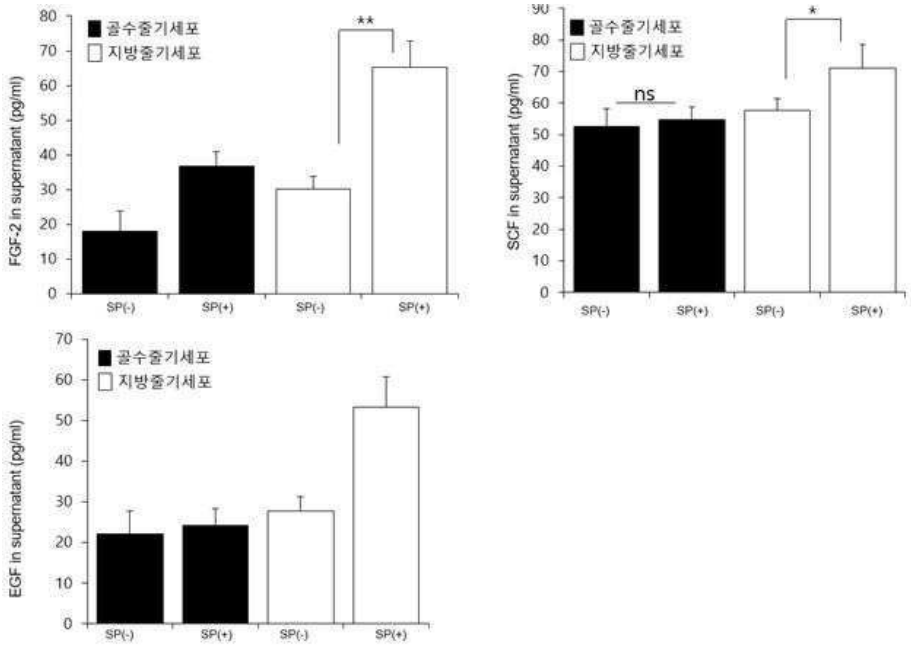
도면1



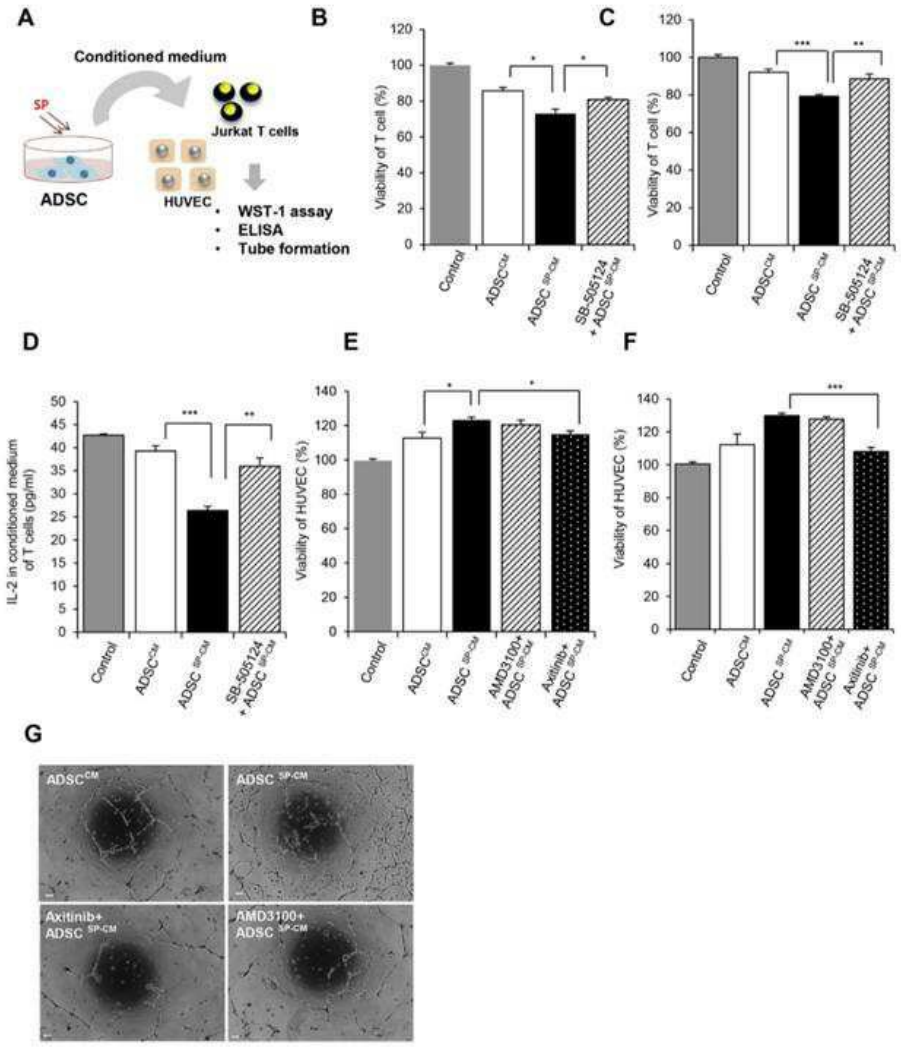
도면2



도면3


골수줄기세포
지방줄기세포
FGF-2 in supernatant (pg/ml)
**
SP(-)
SP(+)
SP(-)
SP(+)
SCF in supernatant (pg/ml)
ns
*
EGF in supernatant (pg/ml)

도면4



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Method for enhancing potential of cytokine secretion of adipose-derived stem cells

<130> P17-074-KHU

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met

1 5 10