



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0010956
(43) 공개일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/39 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0102560

(22) 출원일자 2015년07월20일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

김송철

서울특별시 송파구 올림픽로 435 221동 2002호 (신천동, 파크리오아파트)

이지연

서울 송파구 올림픽로 43 길 88 서울아산병원 아산생명과학연구원 6층

(74) 대리인

특허법인태백

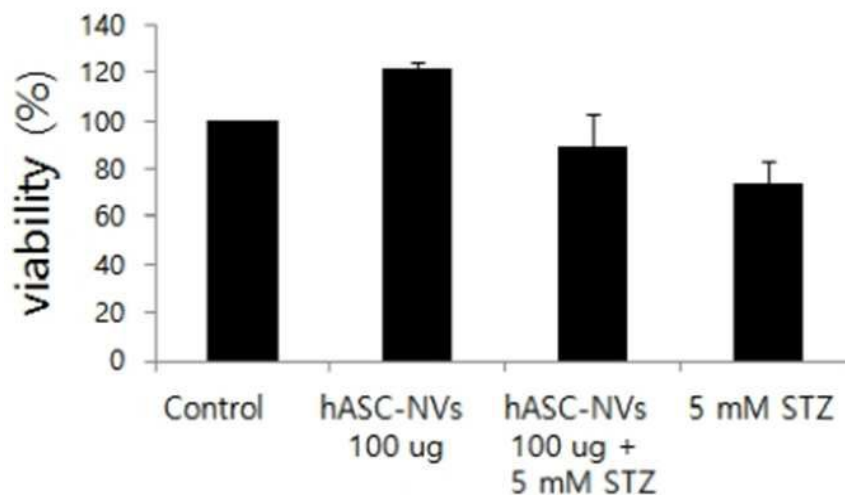
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 줄기세포 유래 인공 소포에 관한 것으로, 상기 줄기세포는 지방조직 유래 줄기세포이며, 이를 췌도세포 손상 물질을 처리한 췌도세포에 처리하면 세포의 생존율이 증가되고 글루코스(glucose)에 의한 인슐린 분비능도 증가되며, 췌도세포를 회복시켜 정상적인 기능을 하는 췌도세포의 글루코스 자극 값(Glucose stimulation index) 값을 갖게 한다. 또한 혈관 재생 및 손상된 세포의 보호와 관련된 사이토카인(cytokine)의 발현을 증가시키고 독성을 나타내지 않아 당뇨병 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 35/39 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0433

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 줄기세포 유래 소포를 이용한 당뇨병의 치료

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2012.08.01 ~ 2014.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포는 지방 조직 유래 줄기세포인 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포 유래 소포는 췌도세포의 기능을 활성화시켜 당뇨병 치료 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포 유래 소포는 50 내지 100 μg 의 농도로 약학 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기세포 유래 소포는 지방 조직으로부터 줄기세포를 분리하고 줄기세포 현탁액을 제조하는 단계; 줄기세포 현탁액을 3 내지 20 μm 의 구멍 크기(pore size)를 갖는 필터에 연속으로 통과시키는 단계; 줄기세포 현탁액에 밀도 구배를 생성하는 단계; 밀도 구배를 생성한 줄기세포 현탁액을 원심분리하는 단계; 및 원심분리된 현탁액에서 소포 층을 수거하는 단계를 통하여 제조하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 췌도세포를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 약학 조성물은 줄기세포 유래 소포 1 내지 2 중량%와 췌도세포 98 내지 99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 줄기세포는 지방 조직 유래 줄기세포인 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 유병율이 매우 높은 대표적인 만성대사성 질환으로, 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린의 세포 수용능력 저하 등으로 생체의 당 이용 능력의 감퇴를 야기하고 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 한다. 혈중에 과잉 존재하게 되는 당은 심장순환계, 신경계 및 신장의 장애를 초래하고 더불어 각종 면역기의 이상과 합병증을 유발시킨다.

[0003] 당뇨병은 제1형과 제2형으로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 이전에 '소아 당뇨병'이라고 불렸었으며, 인슐린을 전혀 생산하지 못하는 것이 원인이 되어 발생하는 질환이다. 인슐린이 상대적으로 부족한 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성(insulin resistance; 혈당을 낮추는 인슐린 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것)을 특징으로 한다.

[0004] 상기 제1형 당뇨병의 경우에는 인슐린 치료가 필요하며 제2형 당뇨병의 경우에는 생활 습관 교정을 기본으로 하며 추가로 약물 투여가 필요할 수 있다. 먹는 약의 경우 하루 1 내지 3회 복용하며 약의 작용 시간에 따라 먹는 시간이라든지 부작용 등이 조금씩 다르다.

[0005] 먹는 혈당강화제는 크게 인슐린 분비 촉진제와 인슐린 감수성 개선제로 나뉜다. 인슐린 분비 촉진제는 설폰요소제(sulfonylurea)와 메글리티나이드(meglitinide)계가 있다. 설폰요소제는 흔히 처방되는 약으로, 저혈당 상태를 유발할 수 있다는 것을 제외하고는 큰 부작용이 없는 편이며, 노보넴(성분명: 레파글리나이드 repaglinide), 파스틱(성분명: 나테글리나이드 nateglinide), 글루페스트(성분명: 미티글리나이드 mitiglinide) 등이 있으며 인슐린 분비 촉진제의 일종인 메글리티나이드계는 약효가 매우 빠른 제제이다.

[0006] 인슐린 감수성 개선제는 단독으로 복용 시 저혈당이 거의 없는 것이 특징이며, 바이구아나이드(biguanide) 계열 약물인 메트포르민(metformin)과, 치아졸리딘다이온(thiazolidinedione) 계열의 아반디아(성분명: 로지글리타존 rosiglitazone), 액토스(성분명: 피오글리타존 pioglitazone) 등이 있다. 그 외에 소장에서 탄수화물 흡수를 지연시키는 글루코바이(성분명: 아카보즈 acarbose), 베이슨(성분명: 보글리보스 voglibose) 등이 있다.

[0007] 하지만 현재 사용되고 있는 경구용 혈당 강화제는 저혈당, 체중 증가, 오심, 구토, 소화 불량, 젖산 축적의 위험성, 신부전증, 간 독성 등 여러 가지 형태의 부작용이 나타날 수 있으며 근본적인 치료에는 한계가 있다.

[0008] 최근 줄기세포 치료에 대하여 뇌경색, 외상성 신경손상, 근골격계 질환 등 다양한 질환에서 다양한 전임상, 임상 연구가 시도되고 있다. 그러나 현재 기술적인 수준은 단순한 줄기세포의 추출 및 배양/증식과 이를 주입하는 정도에 관한 연구까지만 미치고 있으며, 최근까지의 임상연구 결과 이러한 줄기세포 치료는 아직 뚜렷한 효과를 보이지 못하고 있는 것으로 알려졌다. 효과를 증진하기 위한 다양한 유전자 조작 줄기세포에 대한 연구가 진행되고 있으나, 유전자를 이용한 세포 치료는 윤리적인 문제 때문에 인체에서 적용하기 불가능한 한계점이 있다.

[0009] 또한, 줄기세포를 이용하는 방법을 임상에 적용하는데 몇 가지 문제점이 있다. 첫째, 세포치료제의 경우 줄기세포가 조직에 정착한 다음 종괴 형성의 위험성이 있다. 둘째, 줄기세포의 경우 큰 크기로 인해 동맥폐색을 유발하여 뇌경색을 초래할 가능성이 있다. 셋째, 줄기세포의 경우 급성기와 같이 뇌-혈관장벽이 열린 상태에서는 뇌 내로 이동이 용이하나 만성기에서는 큰 크기로 인해 이동에 제한이 있다. 끝으로, 세포치료제의 경우 원하는 성향으로 특화된 세포로 그 성향을 유도하는데 한계가 있다.

[0010] 이에 반해 미세소포를 이용한 치료법은 줄기세포 자체를 이용하는 세포치료법과 차별화되는 방법으로 최근 주목을 받고 있다. 통상적으로 미세소포란 직경 0.1~1 μ m 이하의 작은 소포로서 자극에 의해 내피세포, 혈소판 등의 세포막 일부가 혈중으로 떨어져 나온 것을 의미하는데, 줄기세포에서 유래된 미세소포는 수용체 및 단백질뿐 아니라 핵 성분을 함유하고 있어 세포간 커뮤니케이션 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 상기 미세소포는 줄기세포에 비해 동물혈청을 상대적으로 적게 함유하고 있어 동물 혈청 감염에 의한 증상(zoonosis)의 위험성 역시 배제할 수 있다. 이러한 미세소포의 특성을 고려할 때 미세소포를 이용한 세포치료방법은 기존의 줄기세포 치료법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 패러다임(paradigm)이 될 것으로 기대된다.

[0011] 따라서, 이러한 줄기세포로부터 유래된 미세소포를 줄기세포를 대신하여 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있

다.

[0012] 그러나, 아직까지 줄기세포 유래 미세소포에 대한 연구성과가 많지 않으며, 특히 미세소포와 당뇨병 치료 효과와의 상관관계에 대하여도 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 10-0887234호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서 본 발명은 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

[0015] 또한 본 발명은 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강식품을 제공하는 데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0018] 상기 줄기세포는 지방조직 유래 줄기세포이다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따르면, 지방 줄기세포 유래 인공 소포를 췌도세포 손상 물질을 처리한 췌도세포에 처리하면 세포의 생존율이 증가되고 글루코스(glucose)에 의한 인슐린 분비능도 증가되며, 췌도세포를 회복시켜 정상적인 기능을 하는 췌도세포의 글루코스 자극 값(Glucose stimulation index) 값을 갖게 한다. 또한 혈관 재생 및 손상된 세포의 보호와 관련된 사이토카인(cytokine)의 발현을 증가시키고 독성을 나타내지 않아 당뇨병 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 지방 줄기세포 유래 인공 소포를 제작하는 방법에 관한 그림이며,
 도 2는 생체 내에 주입된 소포의 이동을 확인한 결과이며,
 도 3은 생체 내에 소포를 주입 12일 경과후 췌장 조직 변화를 관찰한 결과이며,
 도 4는 형광물질인 DiI로 염색된 인공 소포를 췌장내에 직접 국소 주입한 후 조직학적 변화를 관찰한 결과이며,
 도 5는 소포의 췌장 재생 작용을 확인한 결과이며,
 도 6은 형광물질인 플레마675(Flamma675)를 이용하여 췌장에서 인공 소포의 시간에 따른 형광 강도를 확인한 결과이며,
 도 7은 인공 소포 주입 13일이 경과한 후 장기 내 형광 발현을 확인한 결과이며,
 도 8은 췌도세포 손상을 억제하기 위한 소포의 농도를 결정한 결과이며,
 도 9는 세포 손상 정도에 따른 소포의 췌도세포 보호 효과를 확인한 결과이며,
 도 10은 소포를 전처리한 후 췌도세포 손상을 유도하고 시간에 따른 췌도세포 보호 효과를 확인한 결과이며,

도 11은 소포 처리에 따른 안티-세포사멸(anti-apoptotic) 및 프로-세포사멸 유전자(pro-apoptotic gene)의 발현을 확인한 결과이며,

도 12 중 A는 글루코스(Glucose) 자극에 의한 인슐린 분비능을 측정한 결과이고, 도 12 중 B는 글루코스 자극 값(Glucose stimulation index) 값을 확인한 결과이며,

도 13은 소포 처리 후 췌도세포에서 분비되는 사이토카인의 변화를 확인한 결과이며,

도 14 중 A는 소포와 췌도세포를 혼합 이식한 경우 혈액지표를 확인한 결과이고, 도 14 중 B는 간 독성을 확인한 결과이며,

도 15는 혼합 이식후 신장, 췌장 조직의 형태를 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명의 발명자는 줄기세포 유래 소포의 기능에 대하여 연구하던 중, 지방줄기세포 유래 소포가 췌도세포의 기능을 활성화시켜 당뇨병 치료 효과를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.
- [0023] 상기 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang et al., Nature, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, Trends Cell Biol., 12:502, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직내에 줄기세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다.
- [0024] 즉, 줄기세포들을 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.
- [0025] 이에 대해, 최근, 지방 조직이 다분화능 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다(B.Cousin et al., BBRC., 301:1016, 2003; A. Miranville et al., Circulation, 110:349, 2004; S. Gronthos et al., J. Cell Physiol., 189:54, 2001; M.J.Seo et al., BBRC., 328:258, 2005). 즉, 지방추출(liposuction)에 의해 얻어진 인간 지방 조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것은 in vitro상에서 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는 세포라는 사실이 보고되었다(P.A.Zuk et al., Tissue Eng., 7:211, 2001; A.M Rodriguez et al., BBRC., 315:255, 2004).
- [0026] 지방 조직은 대량으로 추출 가능하며 골수 등과 같은 다른 조직에서보다 많은 양의 줄기세포를 포함하고 줄기세포의 밀도는 더 높은 것으로 보여지므로, 수요를 만족시킬만한 양을 얻을 수 있으며, 다른 조직을 사용하는 것보다 경제적인 이익을 창출할 수 있고, 윤리적인 문제를 야기하지 않는 장점이 있다.
- [0027] 따라서 본 발명은 줄기세포 유래 소포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 줄기세포이며, 췌도세포의 기능을 활성화시켜서 당뇨병 치료 효과를 보인다.
- [0029] 상기 줄기세포 유래 소포는 50 내지 100 μ g의 농도로 약학 조성물에 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 그러나 만약 상기 범위를 벗어나 저농도로 포함되면 당뇨병 치료 효과가 저하될 수도 있고, 고농도로 포함되면 세포의 생존율이 감소되는 문제가 야기될 수 있다.
- [0031] 특히, 상기 약학 조성물은 줄기세포 유래 소포 1 내지 2 중량%와 췌도세포 98 내지 99 중량%를 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 줄기세포 유래 소포는 지방 조직으로부터 줄기세포를 분리하고 줄기세포 현탁액을 제조하는 단계; 줄기세포 현탁액을 3 내지 20 μ m의 구멍 크기(pore size)를 갖는 필터에 연속으로 통과시키는 단계; 줄기세포 현탁액에 밀도 구배를 생성하는 단계; 밀도 구배를 생성한 줄기세포 현탁액을 원심분리하는 단계; 및 원심분리된 현탁액에서 소포 층을 수거하는 단계를 통하여 제조한다.
- [0033] 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일

리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0036] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.

[0037] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 약학 조성물의 유효성분인 줄기세포 유래 세포의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명에 따른 줄기세포 유래 세포의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0042] 더불어 본 발명은 줄기세포 유래 세포를 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0043] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 본 발명에 따른 화합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0044] 상기 건강식품에 함유된 지방줄기세포 유래 세포의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0045] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0048] <실시예 1> 지방줄기세포(Human adipose tissue-derived stem cells, hASCs) 또는 배아줄기세포(Human embryonic stem cells, mES) 유래 인공 세포

[0049] 1. 세포 추출

[0050] 도 1과 같이, 상용화된 미세필터 사출법을 이용하여 hASCs 유래 인공세포(hASC-NVs)를 제작하였다.

- [0051] 먼저, 사람지방조직 유래 줄기세포 및 배아줄기세포를 PBS로 2회 세척 후, 2mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)을 처리하여 세포를 수거하였다. 수거된 세포를 인산완충식염수(Phosphate buffer saline, PBS)로 재현탁하여 세포 현탁액을 준비하였다.
- [0052] 압출기(Extruder)에 필터 서포트(filter supports)를 장착한 후, 10 μ m의 구멍 크기(pore size)를 갖는 폴리카보네이트 멤브레인(polycarbonate membrane)을 넣은 후 조립하고, 알코올을 통과시켜서 세척한 후 PBS를 통과시켜서 세척하였다. 세척한 압출기에 세포 현탁액을 1ml씩 주입한 후, 3회 통과시켜 수집하였다. 다시 압출기를 분리하여, 5 μ m 기공 크기를 갖는 폴리카보네이트 멤브레인을 장착하여 알코올과 PBS로 수회 세척 후, 10 μ m 멤브레인을 통과시켜 현탁액을 수집하였다.
- [0053] 초원심분리기(Ultracentrifuge) 튜브에 50 % 옵티프렙(optiprep) 1ml, 10% 옵티프렙(optiprep) 1ml을 넣어 밀도차이에 의하여 소포를 분리할 수 있도록 구배(gradient)를 생성하고, 10 μ m 및 5 μ m 멤브레인을 통과하여 수거된 세포 현탁액을 넣은 후, 100,000g의 속도로 1시간 동안 초원심분리(ultracentrifugation)하여 50% 옵티프렙(optiprep)과 10% 옵티프렙(optiprep) 사이의 층에 모여 있는 소포 층을 수거하였다. 수거한 소포를 브래드포드 분석(Bradford assay) 법으로 정량하였다.
- [0054] **2. 형광물질 염색**
- [0055] 소포를 생체 내 주입 후 체내에 퍼지는 이동성을 확인하고자 상기 실시예 1 중 1에서 추출한 소포를 형광물질로 염색하였다. 형광물질은 553/570 nm 형광과장에 반응하는 CellTracker™ CM-DiI(DiI)를 사용하였다. DiI를 1 내지 2mg/mL으로 헝크스의 안정된 염 용액(Hank's Balanced Salt Solution, HBSS) 혹은 PBS에 희석한 후 1 내지 2 μ M의 농도로 소포와 섞은 후 37℃에서 5분간 반응시켰다. 이 후 PBS를 이용하여 소포체를 세척한 후 체장에 직접 주입하거나 꼬리 말초 혈관에 주입하여 소포의 생체 내(in vivo) 영상을 확인하였다.
- [0057] **<실시예 2> 꼬리정맥 주사를 통한 생체내 소포의 영상화**
- [0058] 상기 실시예 1에서 제조한 각각의 인공 소포 100 μ g을 꼬리정맥 주사로 생체내 주입하고 영상화를 통해 시간에 따른 소포의 이동 및 인공 소포에 의한 조직학적 변화를 관찰하였다. 이를 위하여 소포 주입 후 6일 또는 12일에 랫트(백서 모델)를 안락사시킨 후 각 조직을 적출하여 인공 소포와 DiI의 위치를 영상으로 관찰하였다.
- [0059] 그 결과 도 2와 같이, 인공 소포 주입 6일 경과 시 인공 소포가 간, 췌장, 신장에 각각 존재함을 확인하였고, 12일에는 췌장과 신장에서 더 강한 형광 영상을 관찰할 수 있었다. 이는 꼬리 정맥으로 주입된 인공 소포가 혈관을 타고 표류하다 간을 통해 췌장으로 이동하고 신장에서 여과되는 것으로 판단되었다.
- [0060] 더불어 꼬리 정맥을 통해 인공 소포를 주입한 후 12일에 췌장을 적출하고 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)로 고정한 후 파라핀 섹션을 만들어 조직 슬라이드에서 인슐린 형광염색과 DiI 파장의 형광을 비교 분석하였다.
- [0061] 그 결과 도 3과 같이, 인슐린을 분비하는 베타세포를 포함한 췌도세포의 정상적인 조직학적 모습을 관찰할 수 있었다.
- [0063] **<실시예 3> 췌장에 국소적 인공 소포를 주입 후 조직학적 변화 관찰**
- [0064] 랫트(백서 모델)를 개복한 후 췌장을 확인하고 이에 게이지 바늘을 이용하여 DiI로 염색된 인공 소포 100 μ g을 췌장 내에 직접 국소 주입한 후 조직학적 변화를 관찰하였다.
- [0065] 상기 실시예 1에서 제조한 DiI를 염색한 배아세포 유래 인공 소포 그룹과 인공 소포 없이 DiI만을 직접 주입한 그룹으로 나누어서 비교 분석하였다.
- [0066] 헤마톡실린&에오신 염색(hematoxylin & eosin stain, H&E stain)을 이용하여 6일에 얻은 췌장 조직의 조직 변화를 관찰한 결과, 도 4와 같이 DiI 염색약만을 주입한 그룹과 마찬가지로 배아줄기세포 유래 인공 소포를 주입한 그룹 모두에서 췌장의 부분적 재생 부분을 확인할 수 있었다.
- [0067] 조직적으로 췌장의 재생부분은 염증세포가 가득한 부분이 아닌 도관세포가 뭉쳐 있는 모습을 보이고 그 주위로 신생세포들이 가득 차있는 모습을 확인하였다.

[0068] 더불어 DiI만을 주입한 조직에서는 DiI가 췌장의 췌도세포와 외분비세포 모두에 들어가지 않고 주위에 머물고 있는 모습이 보이는 반면, DiI로 염색한 배아줄기세포 유래 인공 소포를 주입한 췌장에서는 세포 내부가 DiI로 염색되어진 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 인공 소포가 세포내로 들어갈 수 있는 특성에 의해 DiI가 기존의 췌장세포에 염색되어진 것으로 판단되었다.

[0070] <실시예 4> 인공 소포의 췌장 재생 작용 확인

[0071] 클러스터린(clusterin)은 췌장의 재생시 나타나는 도관 세포 및 외분비 세포에서 강하게 발현되는 것으로 알려져 있다.

[0072] 따라서 클러스터린과 DiI의 형광 강도를 앞선 실시예 1의 방법으로 비교 분석하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 췌장내 주입된 인공 소포- DiI의 형광 염색이 보이는 부분과 인접해서 클러스터린이 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 인공 소포가 췌장의 재생을 유도하거나 이와 관련된 작용을 하고 있는 것을 확인하였다.

[0074] <실시예 5> 플레마675(Flamma675)를 이용한 인공 소포의 생체 내 영상화

[0075] DiI보다 형광 파장이 높은 Flamma675 탐침을 사용하여 좀 더 정확한 생체 내 영상을 얻었다.

[0076] Flamma675는 세포내 무작위적으로 염색이 되는 방식이 아닌 세포의 아민기에 결합하는 방식으로 한번 결합이 된 후에는 다른 세포로 옮겨가지 않는 장점이 있다.

[0077] Flamma675 200 μ g과 300 μ g의 인공 소포를 섞은 후 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 PD MiniTrop G- 25 컬럼을 이용하여 Flamma675와 결합된 인공 소포와 결합되지 않은 Free-form Flamma675를 분리하였다.

[0078] 그 후, 췌장 내에 국소 주입하여 인공 소포의 생체 내 영상화를 구현하였고, 형광 영상은 13일까지 확인하였다. 그 결과 도 6과 같이, 처음 주입하였을 때 형광 영상은 생체 간섭 영상 없이 췌장 내에서 나타나며, 13일로 갈수록 영상 신호가 약해지는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] 더불어 인공 소포 주입 13일이 경과한 후 마우스를 안락사시키고 각 장기를 적출하고 장기 내 영상을 확인하여 도 7에 나타내었다. 췌장에 국소적으로 주입을 하였지만 간과 신장에서도 형광이 발현되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 췌장과 간에서 발현이 높은 것으로 나타났다. 이는 췌장 내 주입된 인공 소포가 췌장에 머무르지 않고 혈관을 통해 간으로 이동했을 것으로 판단되었다.

[0081] <실시예 6> 소포의 췌도세포 보호 효과 확인

[0082] 1. 췌도세포 분리 및 손상 유도

[0083] 췌도세포는 300g 전후의 Sprague-Dawley(SD) 랫트에서 분리하여 사용하였다. 췌도세포를 분리하기 위하여 췌장을 적출하고 37℃에서 18분간 콜라게나아제(collagenase) XI 처리를 한 후, 피콜 농도구배(Ficoll gradient)에 중첩시키고 원심분리하여 췌도세포를 분리하였다.

[0084] 분리한 췌도세포는 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 포함한 RPMI-1640 배지를 사용하여 배양 접시에서 24시간 배양한 후 순도 높은 췌도세포만을 배양하기 위하여 현미경 하에서 핸드-피킹(hand-picking)하였다.

[0085] 96 웰 플레이트에 췌도세포를 500 IEQ의 농도로 접종하고 24시간 배양한 후 췌도세포 보호효과를 평가하기 위하여 상기 실시예 1에서 제조한 지방줄기세포 유래 소포를 사전 처리하였다. 24시간 후 배지를 교체하고 대표적인 췌도세포 손상 유도 물질인 스트렙토조토신(Streptozotocin, STZ)을 처리하여 췌도세포에 손상을 유도하였다. 24시간 후, 배지 100 μ l에 세포 카운팅 키트-8(Cell counting kit-8, CCK-8) 용액을 10 μ l 혼합하여 췌도세포가 들어있는 각 웰에 첨가하였고, 4시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 췌도세포의 생존율을 측정하였다.

[0086] 2. 췌도세포 손상을 억제하기 위한 소포의 농도 결정

[0087] STZ에 의한 췌도세포 손상을 억제하기 위한 소포의 농도를 결정하기 위하여 50 μ g 및 100 μ g의 농도로 상기 실시예 1에서 제조한 지방줄기세포 유래 소포를 췌도세포에 처리하였다.

[0088] 그 결과 도 8와 같이, 50 μ g 및 100 μ g의 농도로 소포를 처리하였을 경우 생존율이 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한 50 μ g의 소포를 처리하였을 때보다, 100 μ g의 농도로 소포를 처리하였을 때 세포 보호 효과가 증가하였다.

[0089] 따라서, 생체외(in vitro)에서 췌도세포의 보호 효과를 나타내는 적정 농도를 100 μ g으로 선정하여 후속 실험을 진행하였다.

[0090] 3. 소포의 췌도세포 보호 효과 확인

[0091] 도 9와 같이, STZ의 농도를 5 mM의 준치사 투여량(sublethal dosage)으로 처리한 실험군에서 100 μ g의 소포를 처리했을 때 췌도세포 보호 효과를 확인할 수 있었다.

[0093] <실시예 7> 소포를 전처리한 후 췌도세포 손상을 유도하고 시간에 따른 췌도세포 보호 효과 확인

[0094] 앞선 실시예 6과 동일한 방법으로 소포를 전처리한 후 STZ로 췌도세포 손상을 유도하고 시간에 따른 췌도세포 보호 효과를 CCK-8(cell counting kit-8) 분석을 이용하여 확인하였다.

[0095] 그 결과 도 10과 같이, STZ로 세포 손상을 주지 않은 정상 췌도세포군에 소포를 처리하였을 때 소포를 처리하지 않은 대조군에 비하여 생존율이 유의하게 높음을 확인할 수 있었으며, 7일간의 배양기간 동안에도 생존율이 잘 보존되는 것을 확인하였다.

[0096] 또한 소포를 전처리한 후 STZ를 처리하여 췌도세포에 손상을 유도하였을 경우에도, 소포를 처리하지 않고 세포 사멸을 유도한 실험군에 비하여 생존율이 유의하게 높음을 확인할 수 있었다.

[0097] 이러한 결과를 통해 소포가 췌도세포를 보호하여 췌도세포 이식시 장기간 생존할 수 있는 가능성을 확인하였으며, 당뇨병질환 모델에 췌도세포를 이식할 때 소포와 췌도세포를 혼합 이식하여 이식효과 향상을 기대할 수 있었다.

[0099] <실시예 8> 췌도세포 보호 효과 분석: 안티-세포사멸(anti-apoptotic) 및 프로-세포사멸 유전자(pro-apoptotic gene) 발현 분석

[0100] 지방줄기세포 유래 소포의 췌도세포 보호 효과에 있어서, 안티-세포사멸(anti-apoptotic) 및 프로-세포사멸 유전자(pro-apoptotic gene) 발현을 분석하였다.

[0101] 이를 위하여 정상 대조군, 사람 지방조직 줄기세포 유래 소포를 처리한 군, 소포 사전처리 후 5 mM의 STZ로 췌도세포에 손상을 유도한 군, 5 mM의 STZ로 손상만 유도한 군 모두에 트리졸(Trizol)을 처리하여 RNA를 분리한 후, cDNA를 합성하고 RT-PCR과 real time qPCR을 통해 대표적인 anti-apoptotic gene인 B세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)와 pro-apoptotic gene인 Bax의 발현 양상을 비교 분석하였다.

[0102] 이때 RT-PCR를 위해 사용한 프라이머의 서열은 하기 표 1과 같으며, 합성한 cDNA는 서열번호 5 및 서열번호 6과 같다.

표 1

		시퀀스	서열번호
rat Bcl-2	Forward(정방향)	CAT GCG ACC TCT GTT TGA	1
rat Bcl-2	Reverse(역방향)	GTT TCA TGG TCC ATC CTT G	2
rat Bax	Forward(정방향)	ACA CCT GAG CTG ACC TTG	3
rat Bax	Reverse(역방향)	AGC CCA TGA TGG TTC TGA TC	4

[0104] 그 결과 도 11과 같이, 다른 실험군에 비하여 소포를 처리한 군에서 Bcl-2의 발현이 증가하였음을 확인하였고, STZ로 췌도세포에 손상을 유도한 실험군에서 다른 실험군에 비하여 Bax의 발현이 증가하였다.

[0105] 특히 STZ로 손상을 유도한 실험군에 비하여 소포를 사전처리 후 STZ로 손상을 유도하였을 때, Bcl-2의 발현이

증가하는 것을 확인하였다.

[0107] <실시예 9> 소포 처리 후 췌도세포의 인슐린 분비능의 변화 확인

[0108] 소포 처리 후 췌도세포의 인슐린 분비능의 변화를 확인하기 위하여, 글루코스(glucose) 자극에 의한 인슐린 분비(glucose stimulated insulin secretion)능을 주입 후 1일 또는 7일째에 측정하였다.

[0109] 각 실험군을 크랩스-링거 수정된 버퍼(Krebs-Ringer Modified Buffer, KRB buffer)(120 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.1mM MgCl₂, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.1% BSA 포함)로 3차례 세척 후, 1시간 동안 배양한 후, 기저 글루코스(5.5mM)가 포함된 KRB 완충액에서 1시간 동안 전배양한 후, 다시 23mM의 글루코스가 포함된 KRB 완충액에서 1시간 동안 배양한 후, 상층액을 수거하여 분비된 인슐린을 Rat insulin ELISA kit (Alpco)를 사용하여 측정하였다.

[0110] 그 결과 도 12 중 A와 같이, 1일 배양한 경우 소포를 처리한 췌도세포에서 글루코스 자극에 의한 인슐린 분비능이 유의하게 증가함을 확인하였으며(154.49 ± 14.95 vs 296.33 ± 39.26 , $P < 0.01$), 7일 배양 후, 소포를 전처리한 후 STZ를 처리하여 사멸을 유도한 실험군에서 소포를 처리하지 않고 STZ를 처리하여 세포사멸을 유도한 실험군보다 인슐린 분비능이 유의하게 유지되고 있음을 확인할 수 있었다(21.47 ± 6.69 vs 6.39 ± 0.64 , $P < 0.05$).

[0111] 정상적인 기능을 하는 췌도세포의 경우 2 내지 20 사이의 글루코스 자극 값(Glucose stimulation index) 값을 갖는 것으로 알려져 있다. 이에 각 실험군을 글루코스로 자극 후, 1일 및 7일째 인슐린 분비량을 글루코스 자극 값으로 비교하였다. 이때 글루코스 자극 (SI)값은 높은 농도의 글루코스 자극에 따른 인슐린 농도(Insulin concentration after high glucose concentration stimulation)를 낮은 농도의 글루코스 자극에 따른 인슐린 농도(Insulin concentration after low glucose concentration stimulation)로 나누어 산출하였다.

[0112] 그 결과 도 12 중 B와 같이, 소포를 처리한 췌도세포군에서 정상적인 기능을 하는 췌도세포의 글루코스 자극 인 2 내지 20 사이의 지표를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0114] <실시예 10> 소포 처리 후 췌도세포에서 분비되는 사이토카인의 변화 확인

[0115] 6 well plate에 췌도세포를 500 IEQ씩 분주하고, 소포를 100 μ g 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후, 배지를 수거하여 10,000 rpm의 속도로 5분간 원심분리하고 세포 파괴물(cell debris)등이 제거된 상층액을 취하였다.

[0116] 그 후, 랫트 사이토카인 어레이 키트(Rat Cytokine array kit, RayBioTech Inc.)를 사용하여 소포를 처리하였을 때 변화되는 사이토카인을 측정하였다. 측정방법은 제조사가 제공한 지침서를 따라 측정하였으며, 이미지 J 소프트웨어(Image J software)를 사용하여 각 스팟(spot)의 강도(intensity)의 평균치를 계산하고, 양성 신호 정규화(positive signal normalization)와 대조군 정규화(control normalization)을 하여 분석하였다.

[0117] 그 결과 도 13과 같이, 소포를 처리한 실험군에서 혈관재생 및 손상된 세포의 보호에 관련된 사이토카인인 싸이토카인에 의해 유도된 호중구 화학주성인자-2 α (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-2 α , CINC-2 α , CXCL-3), CINC-3 (CXCL2, MIP-2), 인터루킨-6(Interleukin-6, IL-6), IL-10, 단구주화성 단백질(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1, CCL2), 대식세포 염증 단백질-3 α (macrophage inflammatory protein-3 α , MIP-3 α) 및 흉선 케모카인-1(Thymus Chemokine-1, CXCL7)의 분비가 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0118] 대표적 염증성 cytokine인 IL-6의 경우 간세포(hepatocyte)의 재생과 생존에 관여하며, 1차 배양한 췌도세포 및 인슐린혈증 세포주(Insulinoma Cell line)인 MIN6 beta 세포주의 생존에 관여하는 것으로 알려져 있고, 췌장의 알파 세포(alpha cell)와 베타 세포(beta cell)의 증식을 증가시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

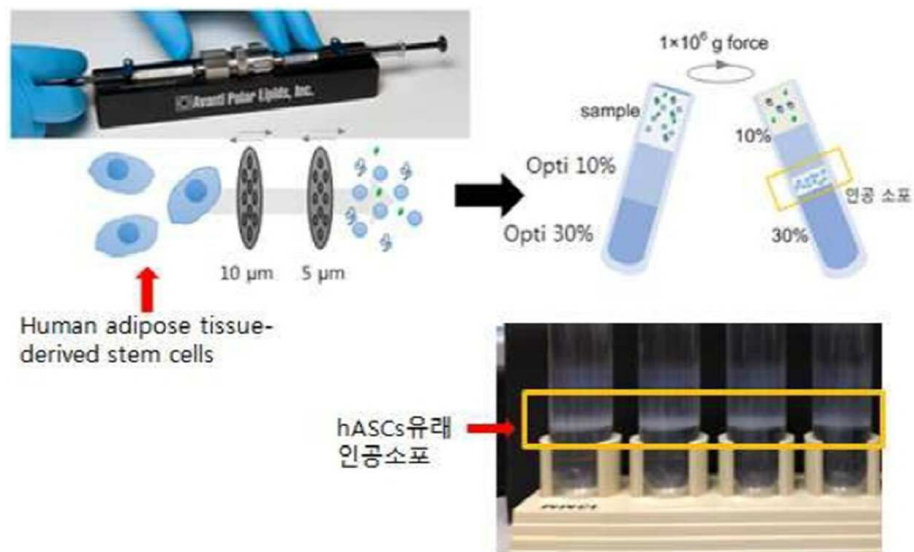
[0119] 더불어 MIP-2 발현에 따른 MCP-1의 발현은 심장 근육 세포(cardiomyocytes)의 세포사멸을 방지하는 데 관여하는 것으로 알려져 있으며, 또한 당뇨병성 부상(diabetic wounds)의 치료에 관여하고, CINC-3와 MCP-1은 생체 외(in vitro)에서 만성림프성 백혈병 세포(chronic lymphocytic leukemia cell)의 생존율을 증진시키는 것으로 알려져 있다.

[0120] 따라서 상기 소포를 처리한 췌도세포의 생존율이 증가하고 세포손상 약물 처리 후에도 세포 보호 효과를 보이는 현상은 이와 같은 세포 생존에 관련된 사이토카인들의 발현에 기인한 것으로 판단되었다.

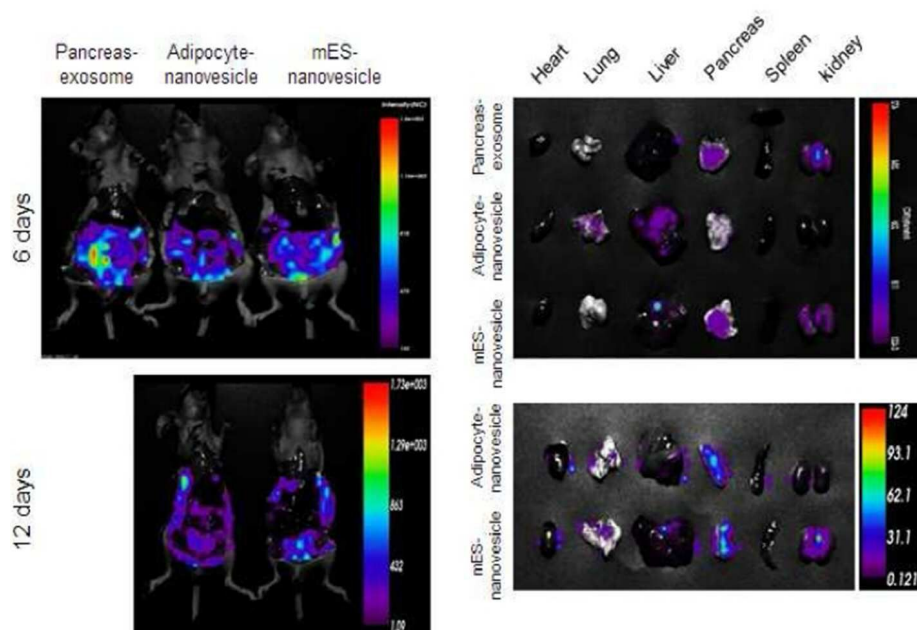
- [0122] <실시예 11> 전혈구 검사(Complete Blood Count, CBC) 측정과 생화학 혈청 검사를 통한 체내 독성 검사
- [0123] 당뇨병환 모델에 췌도세포를 이식할 때 소포와 췌도세포를 혼합 이식하는 경우 이식효과가 향상될 수 있다는 가능성을 상기 실시예 7에서 확인하였으므로 췌도세포와 소포를 누드 마우스(25g)에 혼합 이식하였다.
- [0124] 그 후 체내 독성 유무를 평가하기 위하여, 소포 100 μ g과 췌도세포 300 IEQ를 혼합이식하고 60일이 경과된 마우스를 마취하고 CBC 측정용 혈액을 채취하여 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 튜브에 보존한 후 채혈 당일 CBC 측정하였고, 간독성 지표 인자 생화학 혈청 검사용 혈액은 일반 튜브에 보존한 후, 채혈 당일 혈청을 분리하여 검사를 실시하였다.
- [0125] 그 결과 도 14 중 A와 같이, 소포를 췌도세포와 혼합 이식한 군의 혈액지표를 췌도세포 단독 이식한 실험군 및 정상 대조군의 지표와 비교한 결과, 각 그룹 사이에 차이를 보이지 않았다.
- [0126] 또한 이식한 소포의 생체 내(in vivo)에서 유해성 여부를 확인하기 위하여 각 실험군 및 대조군의 간을 적출하여 H&E 염색을 실시하였다. 소포와 췌도세포를 신장 피막에 혼합이식 60일경과 후, 간을 적출하여 아무런 처치를 하지 않은 정상 대조군 및 췌도세포 단독 이식군과 간조직의 형태적 변화를 비교한 결과 도 14 중 B와 같이, 소포이식으로 인한 간조직의 형태학적 변이는 확인되지 않았다. 따라서 소포의 이식이 체내에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.
- [0128] <실시예 12> 췌도세포와 소포를 혼합 이식한 경우 신장, 췌장 조직의 형태 관찰
- [0129] 상기 실시예들을 통하여 소포가 췌도세포를 보호하여 췌도세포 이식시 장기간 생존할 수 있는 가능성을 확인하였으며, 당뇨병환 모델에 췌도세포를 이식할 때 소포와 췌도세포를 혼합 이식하여 이식효과 향상을 기대할 수 있었다.
- [0130] 따라서 췌도세포 300IEQ와 소포 100 μ g을 혼합 이식한 실험군에서 신장, 췌장 조직의 형태를 관찰하였다.
- [0131] 이식 60일 후, 정상 대조군, 당뇨 대조군, 췌도세포 단독 이식 실험군, 췌도세포와 소포를 혼합 이식한 실험군의 신장 및 췌장 조직을 적출하여 24시간 포르말린에 고정하고, 이후 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록은 블록 절편기를 사용하여 3 μ m 두께로 절단한 후 슬라이드를 제작하였고, 췌장과 신장의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 H&E 염색을 실시하였다.
- [0132] 그 결과 도 15와 같이, 당뇨 대조군의 경우 신장의 구조가 나머지 3개 군의 신장 구조에 비하여 손상이 되었고 소포 혼합 이식군과 췌도세포 단독이식군은 정상적인 신장 구조를 보였으며, 소포로 인한 신장 조직의 변이는 없었다.
- [0133] 더불어 피막에 이식한 췌도세포에서 인슐린의 발현으로 혈당이 정상적으로 조절됨을 확인하였으며, 소포 혼합 이식군에서는 췌도세포가 피막하에 고르게 분포하여 생존하고 있음을 확인하였다.
- [0135] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

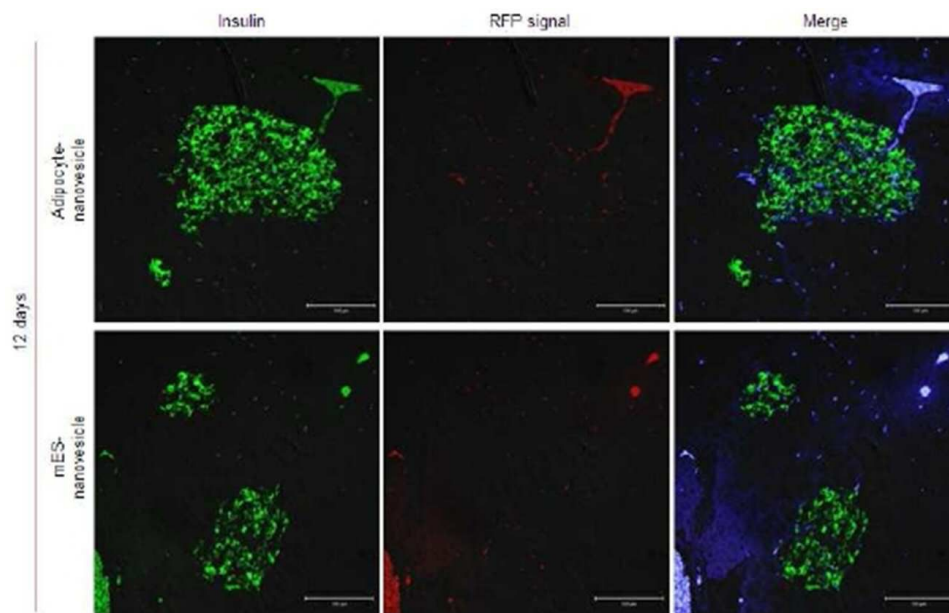
도면1



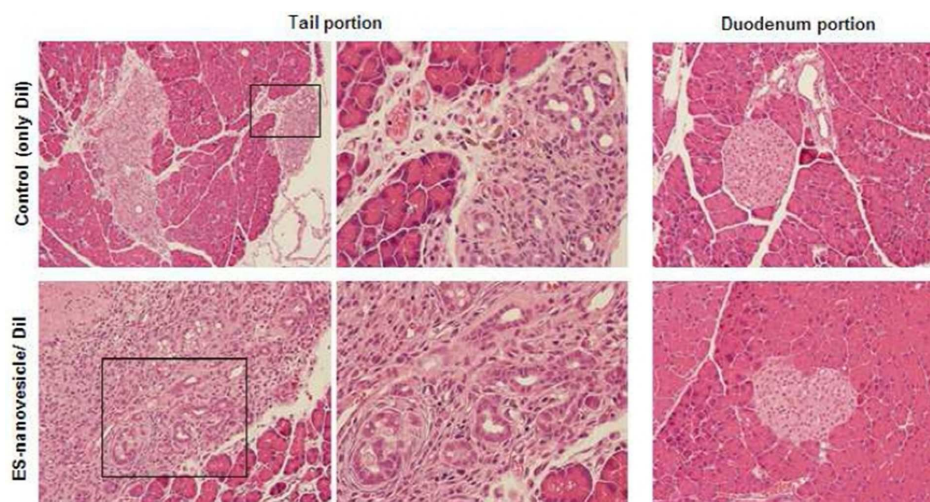
도면2



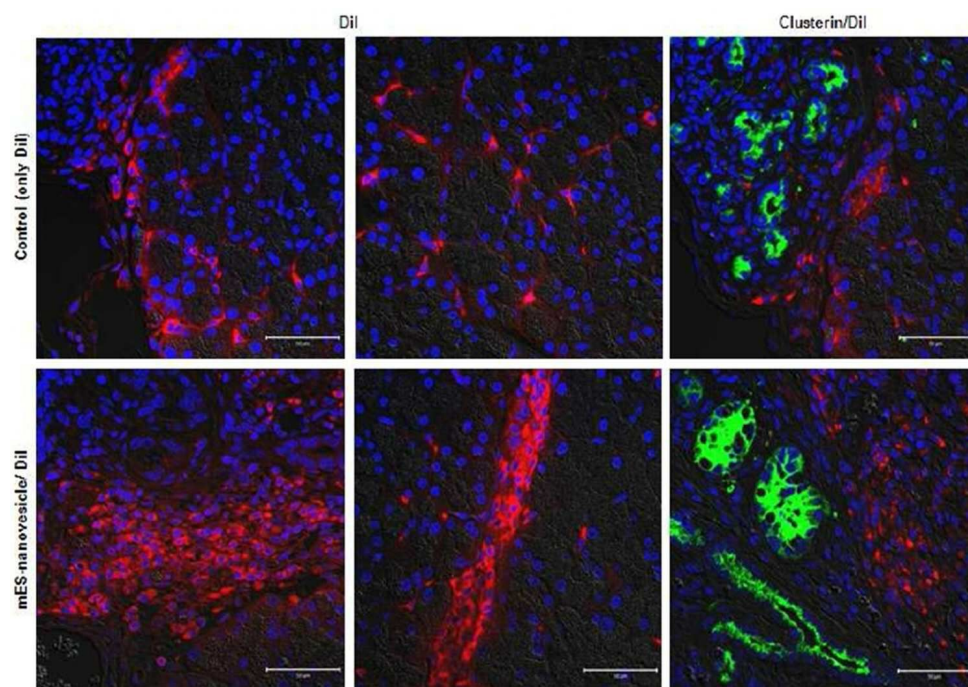
도면3



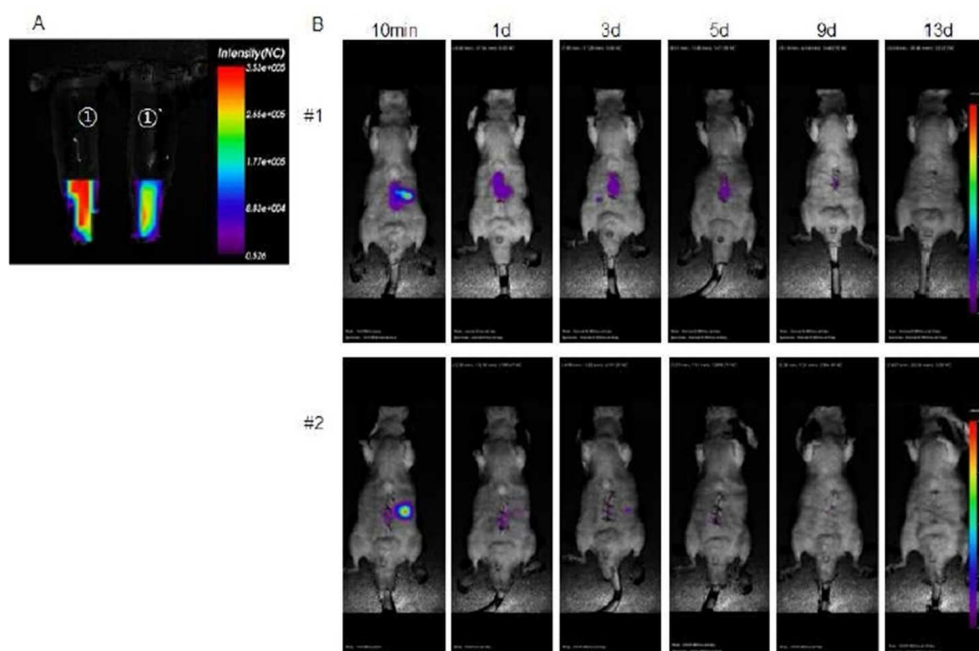
도면4



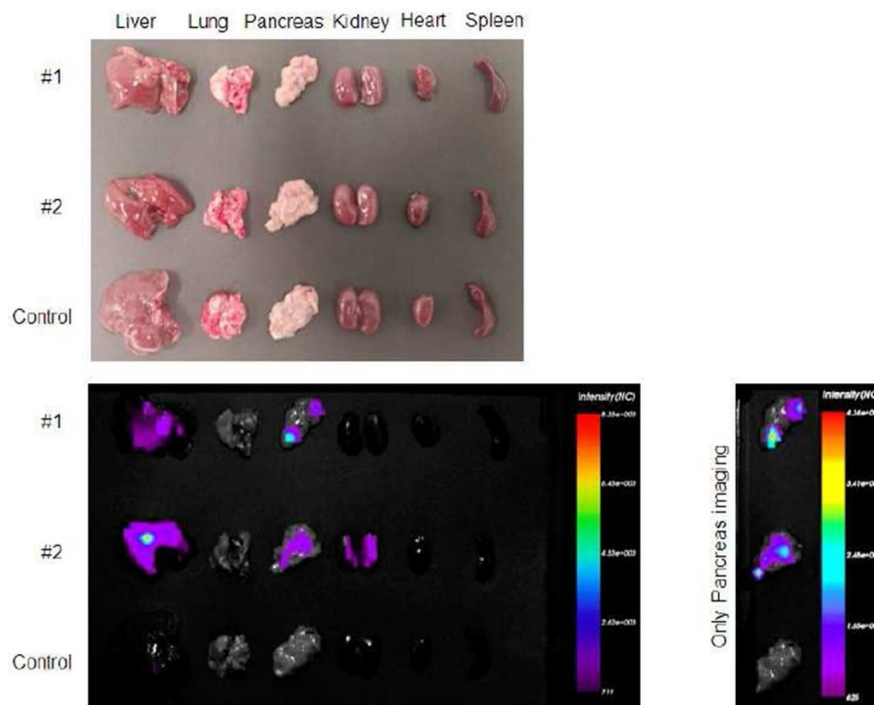
도면5



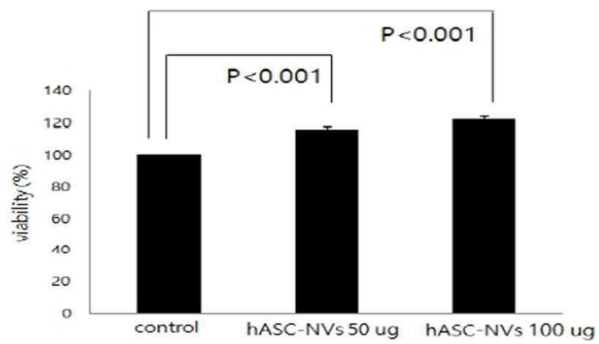
도면6



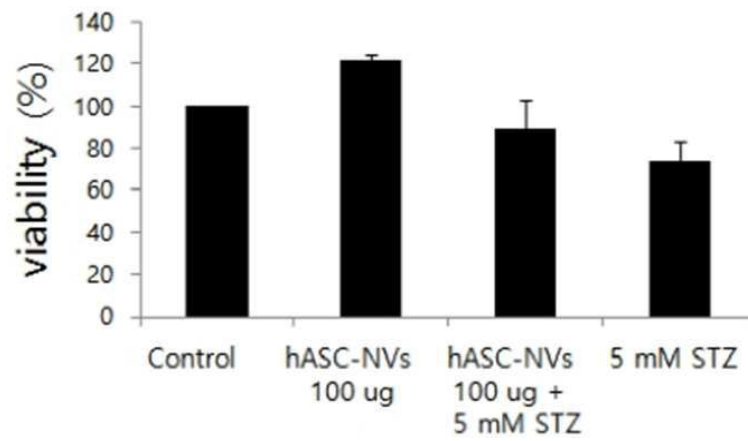
도면7



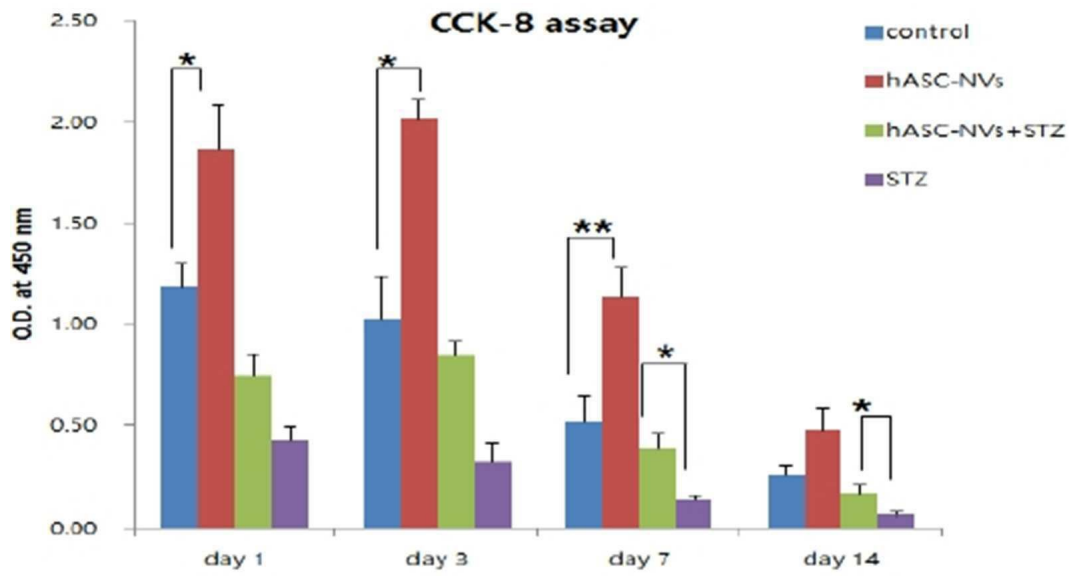
도면8



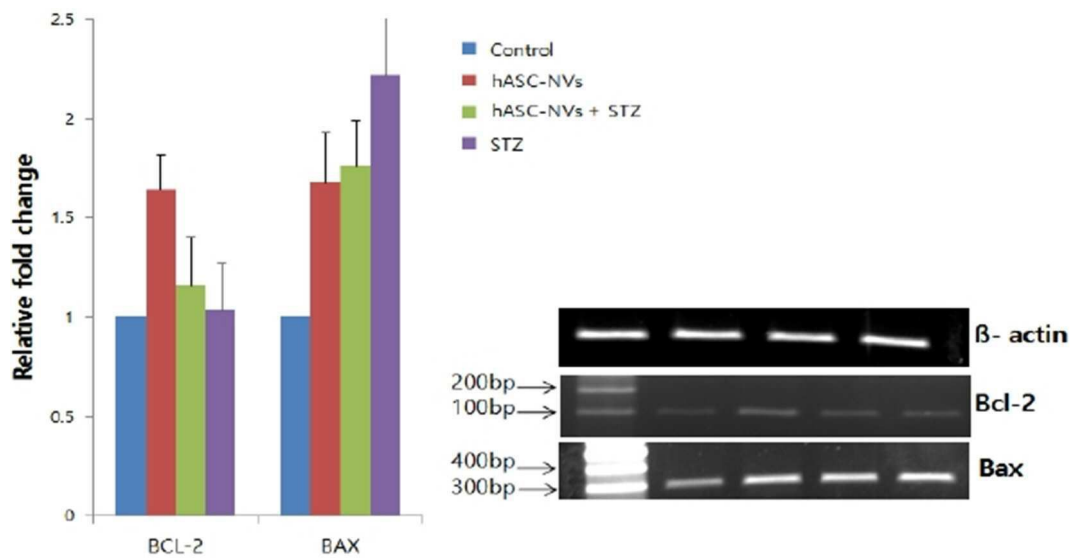
도면9



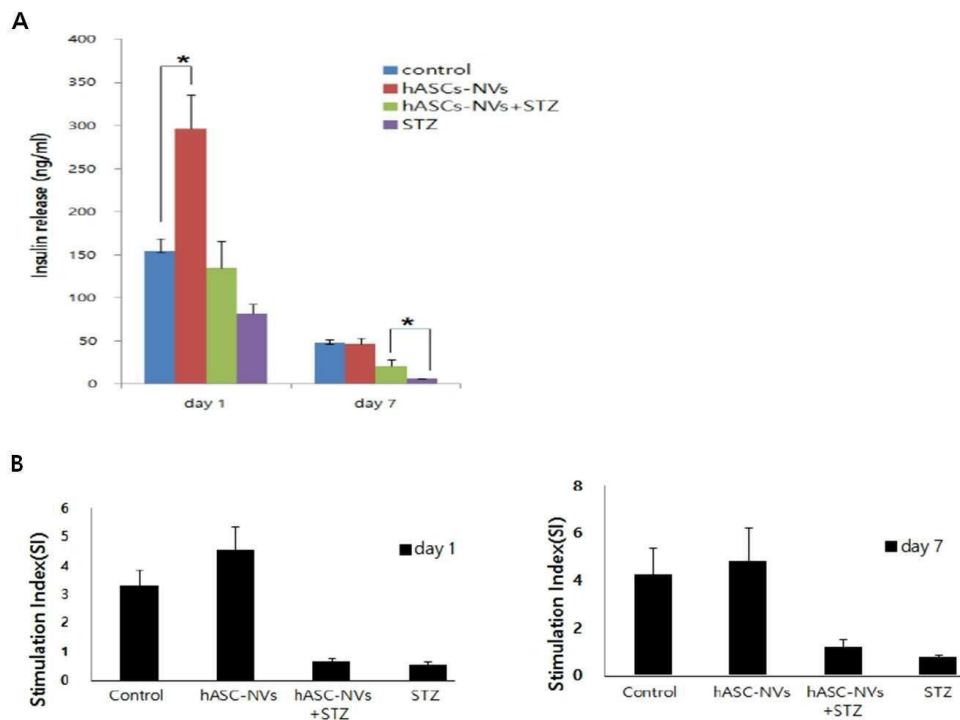
도면10



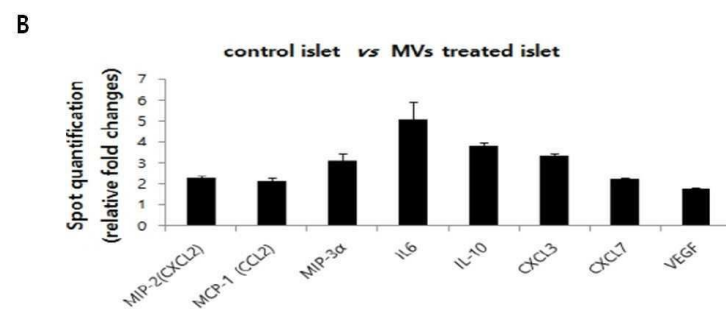
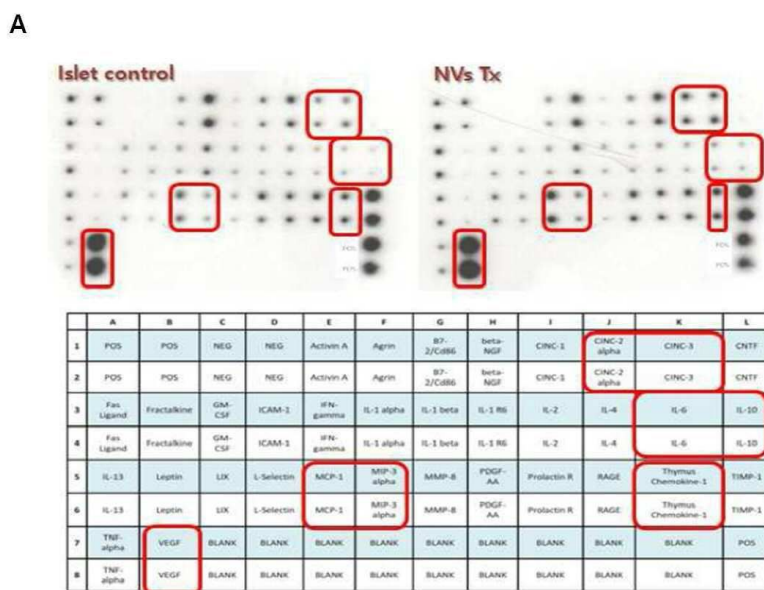
도면11



도면12



도면13



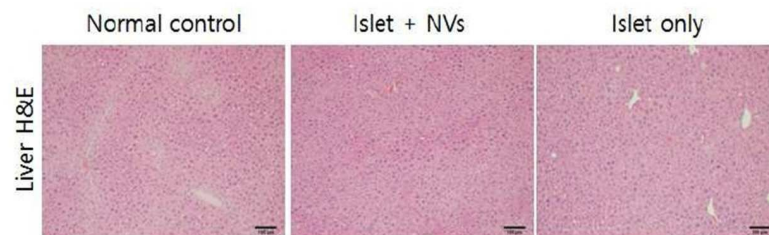
도면14

A

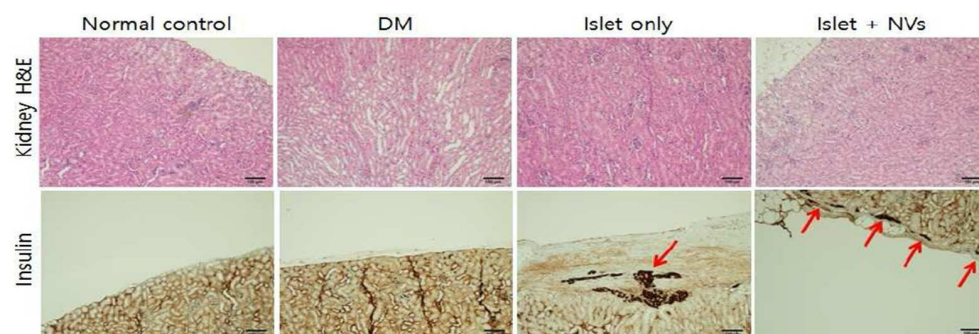
	Normal Control	NVs + islet	islet only	Normal range
WBC (10 ³ /ul)	3.33	3.84	5.18	3.2 -12.7
HGB (g/dL)	13.3	14.6	13.4	11.8 -14.9
PLT (10 ³ /ul)	1050	989	843	766 -1657
AST (U/L)	107.5	79.4	89.7	
ALT (U/L)	40.0	36.9	41.7	

AST (Aspartate aminotransferase)
ALT (Alanine aminotransferase)

B



도면15



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Composition for preventing or treating diabetes comprising stem cells derived exosome
- <130> ADP-2015-0329
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Bcl-2 forward primer
- <400> 1

catgcgacct ctgtttga	18
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bcl-2 reverse primer	
<400> 2	
gtttcatggg ccataccttg	19
<210> 3	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bax forward primer	
<400> 3	
acacctgagc tgaccttg	18
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bax reverse primer	
<400> 4	
agcccatgat ggttctgac	20
<210> 5	
<211> 193	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bcl-2 cDNA sequence	
<400> 5	
catgcgacct ctgtttgatt tctcctggct gtctctgaag acgtgctca gcctggccct	60
ggtggggggc tgcatactc tgggtgcata cctggggccac aagtgaggtc agcagacctg	120
ccccaacaa atatgaaaag gttcactaaa gcagtagaaa ttaatatgca ttatcaagga	180
tggaccatga aac	193
<210> 6	

<211> 292

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bax cDNA sequence

<400> 6

acacctgagc tgaccttgga gcagccgcc caggatgcat ccaccaagaa gctgagcgag	60
tgtctccggc gaattggaga tgaactggac aataatatgg agctgcagag gatgattgct	120
gacgtggaca cggactcccc ccgagaggtc ttcttcggg tggcagctga catgtttgct	180
gatggcaact tcaactgggg ccgctgtggt gccctcttct actttgctag caaactggtg	240
ctcaaggccc tgtgcactaa agtgcccgag ctgatcagaa ccatcatggg ct	292