

## Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/0775   A61L 27/60
Published Date	20071226
Registration No.	1007886320000
Registration Date	20071218
Application No.	1020070053275
Application Date	20070531
Unexamined Publication No.	1020070119497
Unexamined Publication Date	20071220
Priority Claims	1020060054071   20060615   KR
Requested Date of Examination	20070531
Agent.	LEECHYOYOUNG
Inventor	RA,JUNG-CHAN
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

## 발명의 명칭

인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유한 피부미용 또는 성형용 조성물의 제조방법

## Title of Invention

The human adipose tissue originated Multipotent stem cell, and the manufacturing method of the fibroblast and fat or the skin care containing the fat cell or the composition for molding.

## 요약

본 발명은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 피부 미용 또는 성형용 조성물은 피부 탄력을 높이고, 주름 및 피부 처짐을 개선하며, 함몰부위를 성형을 통해 복구하도록 함으로써 미용에 효과적일 뿐만 아니라, 상기 성체 줄기세포가 지방세포로 분화할 수 있어 유방 조직 형성 등에도 유용하다.

지방유래 줄기세포, 섬유아세포, 지방조직, 성형, 미용

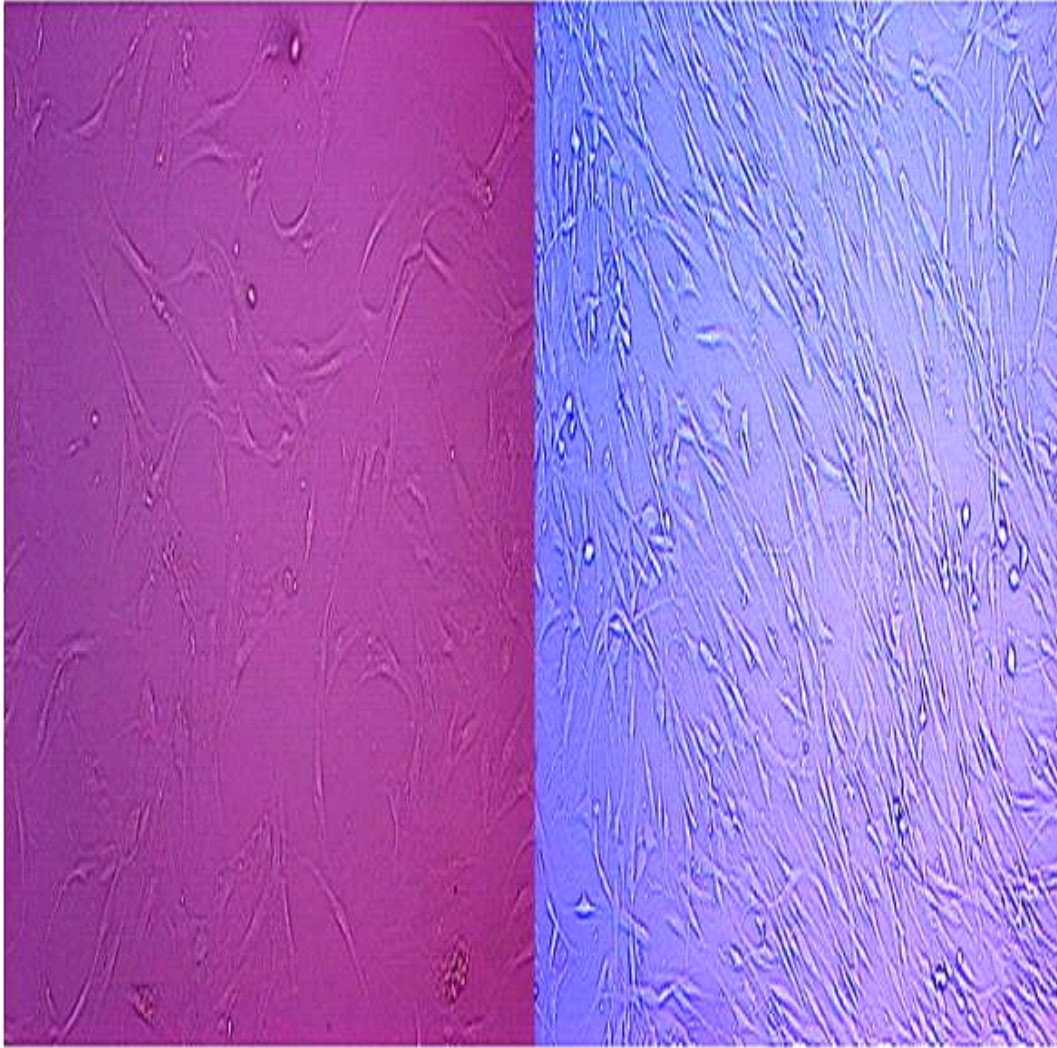
## Abstract

The invention relates to the human fat origin of organization adult stem cell, the fibroblast, and the fat, the skin care, or the composition for molding manufacturing method thereof containing the fat cell.

The skin care according to the present invention or the composition for molding is useful in the breast tissue formation etc. the adult stem cell can specialize in the fat cell the skin firmness is enhanced and it improves to the wrinkle and skin droop and it is effective for the cosmetic effects by being restored the cavity through the molding.

The adipose derived stem cell, the fibroblast, the adipose tissue, the molding, the cosmetic effects .

## 대표도면 (Representative drawing)



**청구의 범위**

**Scope of Claims**

**청구 1항:**

**Claim 1:**

(i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물.

(i) The human fat origin of organization adult stem cell, and (ii) fibroblast and (iii) fat or the skin care or the composition for molding containing the fat cell.

**청구 2항:**

**Claim 2:**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 유방 조직 형성용 또는 주름제 거용인 것을 특징으로 하는 조성물.

As for claim 1, the composition called the composition is the breast tissue formation dragon or the removing wrinkle dragon.

**청구 3항:**

**Claim 3:**

다음의 단계를 포함하는, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법: (a) 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에 의해 얻어진 지방 함유 suspension을 배양용기에서 배양한 다음, 상기 배양용기 표면에 부착된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

(i) human fat origin of organization adult stem cell, and the manufacturing method of (ii) fibroblast and (iii) fat or the skin care containing the fat cell or the composition for molding including the following step: the fat originated adult stem cell adhered to the culture vessel surface the saturated fat suspension obtained with the liposuction of (a) human adipose tissue is cultivated in the culture vessel, the step of collecting the fibroblast contained cell layer and step of mixing with the fat or the fat cell the fat originated adult stem cell and the fibroblast

oblast contained cell layer collected with (b) the above.

**청구 4항:**

**Claim 4:**

제3항에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중배엽 유래 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

As for claim 3, the method in which adult stem cell is mesoderm cellular origin.

**청구 5항:**

**Claim 5:**

제3항에 있어서, 상기 지방 유래 성체 줄기세포는 덱사메타손 (dexamethasone), 인도메타신 (indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한  $\alpha$ -MEM 배지에서 배양하여 지방세포로 분화되는 것을 특징으로 하는 방법.

As for claim 3, the method for cultivating in  $\alpha$ -MEM culture medium containing the fat originated adult stem cell is the dexamethasone, the indomethacin, and insulin and IBMX and being specialized to the fat cell.

**청구 6항:**

**Claim 6:**

다음의 단계를 포함하는 (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법: (a) 인간 지방조직 유래 펠렛을 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양하여 지방 유래 성체 줄기세포를 제조한 다음, 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

The human fat origin of organization adult stem cell, and the manufacturing method of (ii) fibroblast and (iii) fat or the skin care containing the fat cell or the composition for molding including the following step: the step of collecting the adipose derived stem cell and fibroblast it manufactures and step of mixing with the fat or the fat cell the fat originated adult stem cell and the fibroblast collected with (b) the above.

**배경기술**

**Background Art**

본 발명은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물 그 제조방법에 관한 것이다.

The invention relates to the human fat origin of organization adult stem cell, the fibroblast, and the fat, the skin care, or the composition for molding manufacturing method thereof containing the fat cell.

줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포로, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.

While having the self copy ability it can classify into two or more cells into the cell having the capability specializing and the stem cell can classify into the pluripotent stem cell (totipotent stem cell), the pluripotent stem cell (pluripotent stem cells), and the Multipotent stem cell (multipotent stem cells).

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(지방흡입술(liposuction))에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것이 in vitro상에서 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는다는 것이 보고되었다 (P.A. Zuk et al., Tissue Eng., 7:211, 2001; A.M. Rodriguez et al., BBRC, 315:255, 2004). 아울러 지방 조직 유래 세포가 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있다는 것이 동물 모델 실험을 통하여 알려진 바 있다. 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점이 있어, 기존의 단점을 보완하는 새로운 줄기세포의 소스로 주목받고 있다.

Recently, it was clarified that the adipose tissue was the new source of the Multipotent stem cell (B. Cousin et al., BBRC, 301:1016, 2003; A. Miranville et al., Circulation, 110:349, 2004; S. Gronthos et al., J. Cell Physiology, 189:54, 2001; M.J. Seo et al., BBRC, 328:258, 2005). That is, the pulverization cell aggregates was included in the human adipose tissue obtained with the fat extraction (liposuction). This was reported on in vitro to have the fat cell, the bony osteogenesis cell, and the blastogenesis to the sarcoblast and precartilage (P.A. Zuk et al., Tissue Eng., 7:211, 2001; A.M. Rodriguez et al., BBRC, 315:255, 2004). And it is known via the animal model experiment that it has the capability in which the adipose tissue cellular origin promotes the muscle play performance and vasa nervorum differentiation. It has the advantage that this adipose tissue massively can extract. It paid attention to the source of the new stem cell complementing the existing disadvantage.

지금까지 알려진 지방 유래 줄기세포로는 상피세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기 세포 (M. Brzoska et al., BBRC, 330:142, 2005), 골 형성 및 지방 세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포 (Y. Cao et al., BBRC, 332:370, 2005)

The so far known adipose derived stem cell may be the human fat originated adult stem cell (M. Brzoska et al., BBRC, 330:142, 2005), which is possible through the epithelial cell with differentiation the human fat originated

05), 신경세포로 분화가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포 (K.M. Safford et al., BBRC, 294:371, 2005), 지방세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (R. Ogawa et al., BBRC, 319:511, 2004), 골 형성 및 연골 형성세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (R. Ogawa et al., BBRC, 313:871, 2004), 연골세포로 분화가능한 인간 지방 유래 줄기세포 (H.A. Awad et al., Biomaterials, 25:3211, 2004), 신경 세포로 분화가능한 쥐 지방 유래 줄기세포 (J. Fujimura et al., BBRC, 333:116, 2005) 및 골세포, 연골세포, 신경세포 또는 근육세포로 분화가능한 지방 유래 줄기세포 (미국특허 6,777,231) 등이 있다.

adult stem cell (Y. Cao et al., BBRC, 332:370, 2005), which is possible through the osteogenesis and fat cell with differentiation the human fat originated adult stem cell (K.M. Safford et al., BBRC, 294:371, 2005), which is possible through the nerve cell with differentiation the rat adipose derived stem cell (R. Ogawa et al., BBRC, 319:511, 2004), which is possible through the fat cell with differentiation the rat adipose derived stem cell (R. Ogawa et al., BBRC, 313:871, 2004), which is possible through the osteogenesis and cartilage formatting cell with differentiation the human adipose derived stem cell (H.A. Awad et al., Biomaterials, 25:3211, 2004), which is possible through the cartilage cell with differentiation the rat adipose derived stem cell (J. Fujimura et al., BBRC, 333:116, 2005) which is possible through the nerve cell with differentiation and adipose derived stem cell (US6,777,231 A) etc. is possible through the bone cell, the cartilage cell, and the nerve cell or the muscular cell with differentiation.

현재까지 이러한 지방 유래 줄기세포는 주로 난치병 등의 치료를 포함한 의학 분야에서 이용하고자 하는 노력이 계속되었으나, 미용 또는 성형을 목적으로 줄기세포를 이용하고자 하는 시도는 미비하였다.

It made an effort constantly in the medical field in which such adipose derived stem cell mainly included the treatment including the intractable disease etc. But of using the attempt to use the stem cell the cosmetic effects or the molding with the purpose was insufficient.

이에 본 발명자들은 주름 개선, 피부의 처짐 방지 등의 미용 및 성형 분야에 줄기세포를 이용하고자 예의 노력한 결과, 지방흡입술 (liposuction)으로부터 얻어진 지방 함유 suspension을 배양하여 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수한 다음, 지방과 혼합한 결과, 미용 및 성형에 효과적이라는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, it made many efforts so that the inventors use the stem cell for the cosmetic effects and formation field including the wrinkle improving, the prevention of drooping of skin etc. Then after the saturated fat suspension obtained from the liposuction was cultivated and the adult stem cell and fibroblast contained cell layer were collected it mixed with the fat. Then it confirmed. It was effective for the cosmetic effects and molding the invention was completed.

## 발명의 내용

## Summary of Invention

### 발명의 효과

### Effects of the Invention

이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따른 피부 미용 또는 성형용 조성물은 피부 탄력을 높이고, 주름 및 피부 처짐을 개선하며, 함유부위를 성형을 통해 복구하도록 함으로써 미용에 효과적일 뿐만 아니라, 상기 성체 줄기세포가 지방세포로 분화할 수 있어 유방 조직 형성 등에도 유용하다.

As described in detail in the above, the present invention has the effect that the human fat origin of organization adult stem cell, and the fibroblast and fat or the skin care or the composition for molding containing the fat cell are provided. The skin care according to the present invention or the composition for molding is useful in the breast tissue formation etc. the adult stem cell can specialize in the fat cell the skin firmness is enhanced and it improves to the wrinkle and skin droop and it is effective for the cosmetic effects by being restored the cavity through the molding.

이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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

The specific part of the content of the present invention was particularly described to the or more. And the or more has to a person skilled in the art of the relevant industry. It is the embodiment which this concrete technology only does with desirable. And it will be clear the scope of the present invention is not limited by this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached

## 기술적 과제

본 발명의 목적은 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 미용 또는 성형용 조성물 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

## 발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 인간 지방 조직의 지방흡입술 (liposuction)에 의해 얻어진 지방 함유 suspension을 배양용기에서 배양한 다음, 상기 배양용기에 부착된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계를 포함하는, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 또한, (a) 인간 지방조직 유래 펩티드를 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양하여 지방 유래 성체 줄기세포를 제조한 다음, 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계를 포함하는, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 또한, (i) 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, (ii) 섬유아세포 및 (iii) 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제공한다.

본 발명은 일 관점에서, 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 미용 또는 성형용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조성물은 유방 조직 형성을 통한 가슴 확대용 또는 주름제거용인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대, 미세지방 이식술, 자가지방 이식술 등 얼굴의 얼굴의 팔자 주름 및 미간주름 제거 및 탄력 유지를 목적으로 사용할 수도 있다. 본 발명에 따른 조성물에 함유되는 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방은 자가 유래 세포인 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 미용 또는 성형용 조성물은 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에서 얻어지는 지방 함유 suspension을 배양하여 수득된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 기타 다른 세포 또는 조직과 혼합하여 제조할 수 있다.

일 구현예에서, 피부 미용 또는 성형용 조성물은 다음 단계를

## Technical Task

This Purpose of the invention is the human fat origin of organization adult stem cell, and the fibroblast and fat or the cosmetic effects or the composition for molding containing the fat cell and manufacturing method there of are to be provided.

## Structure & Operation of the Invention

The above, to accomplish the above objects. And the invention provides (i) human fat origin of organization adult stem cell, and the manufacturing method of (ii) fibroblast and (iii) fat or the skin care containing the fat cell or the composition for molding including the fat originated adult stem cell adhered to the culture vessel the saturated fat suspension obtained with the liposuction of (a) human adipose tissue is cultivated in the culture vessel, the step of collecting the fibroblast contained cell layer and step of mixing with the fat or the fat cell the fat originated adult stem cell and the fibroblast contained cell layer collected with (b) the above.

The invention provides (i) human fat origin of organization adult stem cell, and the manufacturing method of (ii) fibroblast and (iii) fat or the skin care containing the fat cell or the composition for molding including the step of collecting the adipose derived stem cell and fibroblast it manufactures and step of mixing with the fat or the fat cell the fat originated adult stem cell and the fibroblast collected with (b) the above.

The invention provides moreover, (i) human fat origin of organization adult stem cell, (ii) fibroblast, and (iii) fat, the skin care, or the composition for molding containing the fat cell.

The invention relates to the human fat origin of organization adult stem cell in the consistency, the fibroblast, and the fat, the cosmetic effects, or the composition for molding containing the fat cell.

The composite according to the present invention is the breast magnification through the breast tissue formation or the removing wrinkle dragon. But it is not thus limited. For example, the fate wrinkle of the face of face and middle of the forehead removing wrinkle and elasticity maintenance including the fine paper room grafting, the autologous fat grafting etc. can be used as the purpose. The human fat origin of organization adult stem cell contained in the composite according to the present invention, and the fibroblast and fat may be the desirable the person is the cellular origin.

The fat originated adult stem cell and the fibroblast in which the cosmetic effects according to the present invention or the composition for molding cultivates the obtained saturated fat suspension in the liposuction of the human adipose tissue and which is obtained are mixed with the other other cell or the organization and the fibroblast can manufacture.

In one embodiment, the skin care or the composition

거쳐 제조할 수 있다: (a) 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에 의해 얻어진 지방 함유 suspension을 배양용기에서 배양한 다음, 상기 배양용기에 부착된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포 함유 세포층을 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

더욱 구체적으로는, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 및 섬유아세포를 회수 직전에 생리식염수로 1회 세척하여 상층액의 잔여 지방 및 혈구세포 등을 제거하고, 바닥에 부착된 줄기세포 및 섬유아세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접회수하거나, 또는 원심분리하여 원심분리된 세포층을 회수하여, 지방과 혼합하여 제조한다.

본 발명에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 중배엽 유래 세포인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 중배엽 유래 세포는 지방세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 성체 줄기세포는 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한  $\alpha$ -MEM 배지에 배양하여 지방세포로 분화되는 것을 특징으로 할 수 있다.

다른 구현예에서, 피부 미용 또는 성형용 조성물은 다음 단계를 거쳐 제조할 수 있다: (a) 인간 지방조직 유래 펩티드를 NAC(N-acetyl-L-cysteine) 함유 배지에서 배양하여 지방 유래 성체 줄기세포를 제조한 다음, 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 회수하는 단계; 및 (b) 상기 회수된 지방 유래 성체 줄기세포 및 섬유아세포를 지방 또는 지방세포와 혼합하는 단계.

상기 지방흡입술(liposuction)은 지방 제거의 미용 또는 성형 수술의 한 기법으로서, 지방질 부분을 절개하여 진공 펌프로 지방질을 뽑아내는 것 또는 주사기의 압력으로 뽑아내는 것을 의미한다.

본 발명에 있어서, 지방 또는 지방세포는 인간 지방 조직의 지방흡입술 (liposuction)에서 부수적으로 얻어지는 것을 사용할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 본 발명에서 지방은 지방조직을 포함한다.

본 발명의 피부 미용 또는 성형용 조성물은 지방을 사용할 경우에는 지방조직은 1ml에 대하여 1#215#104~1#215#107개의 지방유래 줄기세포와 섬유아세포를 함유하는 것이 바람직하고, 지방세포를 사용할 경우에는 지방유래 줄기세포와 섬유아세포의 총세포수에 대하여 1~50배의 지방세포를 사용하는 것이 바람직하다.

아울러, 섬유아세포(fibroblast)는 섬유성 결합조직의 중요한 성분을 이루는 세포로서, 섬유세포라고도 한다. 조직절편으로 관찰하면 편평하고 길쭉한 외형을 가지며 흔히 불규칙한 돌기를 보인다. 세포질은 미토콘드리아, 골지체, 중심체, 소지방체 등을 포함하고 그 밖에 특수한 분화는 나타내지 않는다. 핵은

for molding can manufacture after the following step: the fat originated adult stem cell adhered to the culture vessel the saturated fat suspension obtained with the liposuction of (a) human adipose tissue is cultivated in the culture vessel, the step of collecting the fibroblast contained cell layer and step of mixing with the fat or the fat cell the fat originated adult stem cell and the fibroblast contained cell layer collected with (b) the above.

More specifically, it collects after processing the stem cell adhered to the culture vessel including the flask etc. the saturated fat suspension floated in the saline solution obtained from the liposuction is cultivated, the stem cell adhered to the bottom surface it washes to the saline solution with 1 time and fibroblast layer as trypsin or it directly withdraws to scratch by the scraper and be floated in a small amount of saline solution or it centrifuges and or the cell layer which is centrifugally separated is collected. It mixes with the fat and it manufactures.

In the present invention, the adult stem cell may be the mesoderm cellular origin is the fat cell it is the mesoderm cellular origin.

It cultivates in  $\alpha$ -MEM culture medium containing the adult stem cell is the dexamethasone, the indomethacin, and insulin and IBMX and in the present invention, it is specialized to the fat cell.

In the other implementation, the skin care or the composition for molding can manufacture after the following step: the step of collecting the adipose derived stem cell and fibroblast it manufactures and step of mixing with the fat or the fat cell the fat originated adult stem cell and the fibroblast collected with (b) the above.

As the liposuction is one technique of the cosmetic effects of the fat removal or the plastic surgery, the fat part is cut out and the fat is pulled out with the vacuum pump or it means to pull out with the pressure of the scanner.

The liposuction can use that the fat or the fat cell is incidentally obtained in the liposuction of the human adipose tissue. But it is not thus limited. In the present invention, the fat comprises the adipose tissue.

The skin care of the present invention or the composition for molding is the fat may be referred to be desirable to use the fat cell of 1~50 ship about the total cell number of the adipose derived stem cell and fibroblast the fat cell is used it is the be desirable that the adipose tissue contains the adipose derived stem cell and fibroblast of  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  about 1ml in case of using.

And as the cell in which the fibroblast is comprised the important component of the fibrous tissue, it is called the fibrous cell. While having the outer shape flat and longish if it observes to the tissue section the irregular protrusion is generally shown. The cytoplasm includes the

염색성이 약하고 타원형이며 인을 함유한다. 교원섬유에 밀접해 있는 경우가 많고, 그 형성에 관계가 있다고 생각되므로 상기와 같은 명칭이 붙었다. 본 발명에서 상기 섬유아세포는 지방조직으로부터 줄기세포를 분리하는 과정에서 함께 분리할 수 있다.

한편, 상기에서 수득한 인간 지방조직 유래 줄기세포액으로부터 목적의 표면항원을 발현하고 있는 다분화능 줄기세포를 수득하는 방법으로서 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법 (Int. Immunol., 10(3):275, 1998), 자기비즈를 사용하는 방법, 다분화능 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법 (J. Immunol., 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 대량의 배양액 등으로부터 다분화능 줄기세포를 수득하는 방법으로서, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.

플로우 사이토미터 소팅 방식으로서, 수적하전 방식, 셀캡처 방식 등을 들 수 있다. 어떠한 방법도 세포의 표면항원을 특이적으로 인식하는 항체를 형광으로 표지하고, 표지된 항체와 항원의 결합체에 대한 형광을 측정하여 형광 강도를 전기 신호로 변환함으로써 세포의 항원 발현량을 정량할 수 있다. 또한, 사용하는 형광물질의 종류를 조합함으로써, 복수의 표면 항원을 발현하고 있는 세포를 분리하는 것도 가능하다. 여기에 사용가능한 형광물질로는, FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), APC (allo-phycoerythrin), TR (Texas Red), Cy3, CyChrome, Red613, Red670, TRI-Color, QuantumRed 등이 있다.

플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서, 상기에서 수득한 줄기세포용액을 수집하고, 원심분리 등의 방법으로 세포를 분리한 후, 직접 항체로 염색하는 방법과 한번 적당한 배지 중에서 배양, 증식을 실시한 후에 항체를 염색하는 방법을 이용할 수 있다. 세포의 염색은 우선, 표면 항원을 인식하는 일차항체와 목적 세포샘플을 혼합하고, 얼음 위에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 일차 항체가 형광으로 표지되어 있는 경우에는 세정 후 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다. 일차 항체가 형광 표지되어 있지 않은 경우에는 세정 후 일차 항체에 대해서 결합 활성을 갖는 형광 표지된 이차 항체와 일차 항체가 반응한 세포를 혼합하고, 다시 얼음물에서 30분 내지 1시간 인큐베이션한다. 세정 후, 일차 항체와 이차 항체에서 염색된 세포를 플로우 사이토미터로 분리를 실시한다.

본 발명에 따른 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방을 함유하는 조성물은 피부 탄력을 높이고, 주름 특히 얼굴의 팔자 주름 및 미간주름과 피부 처짐을 개선하며, 함유물부위를 성형을 통해 복구하도록 함으로써 미용에 효과적이다. 아울러, 상기 인간 지방 조직 유래 성체 줄기세포는 지방세포로 분화할 수 있으므로 본 발명에 따른 조성물은 지방 조직 형성 등에도 유용하다.

e mitochondria, the Golgi body, the microspher, the beef fat etc and the besides that special differentiation does not show. The dyeability as to the nucleus, is weak and it is the ellipse and the phosphorus is contained. There is much case of being close to the collagen fiber. Since being regarded because the relationship was in the formation the name as described above stuck. In the present invention, in a process of separating the fibroblast is the stem cell from the adipose tissue, it together can separate.

In the meantime, in the above case, it has the flow cytometer having sorting function method using the FACS method (Int. Immunol., 10(3):275, 1998) used, and the magnetism biz, and the panning (J. Immunol., 141(8):2797, 1998) etc using the antibody which specifically recognizes the Multipotent stem cell as the method of obtaining the Multipotent stem cell which is revealed the surface antigen of the purpose from the obtained human adipose tissue-originated stem cell liquid. Moreover, as the method of obtaining the Multipotent stem cell including the culture fluid of bulk etc, it has the method of using as the column the singleness or this the antibody which specifically recognizes clearly it assembles.

As the flow cytometer sorting mode, the number dropping front type, the cell capture mode etc. can be given. Any method notes antibody which specifically recognizes clearly the surface antigen of the cell by fluorescence. The fluorescence about the corporate body of the marked antibody and antigen are measured and the fluorescence intensity is converted into the electric signal antibody has the revelation of antigen amount of the cell. Moreover, the kind of the fluorescent material used is assembled it is possible to separate the cell expressing multiple surface antigens. Here, the usable fluorescent material may be the FITC, the PE (phycoerythrin), the APC (allo-phycoerythrin), the TR (TexasRed), the Cy3, the CyChrome, the Red613, the Red670, the TRI-Color, the QuantumRed etc.

As the FACS method using flow cytometer, the method of dyeing the antibody it performs can be used. The primary antibody and the target cell sample in which firstly the dyeing of the cell recognizes clearly the surface antigen are mixed. It incubates in 30 minutes to 1 hour in ice. The separation is performed after washing to the flow cytometer in case the primary antibody is marked by fluorescence. The cell in which the second antibody labeled by fluorescence and the primary antibody having the bonding activity about the primary antibody after washing the primary antibody is not labeled by fluorescence react is mixed. It the again incubates in the iced water with 30 minutes to 1 hour. The cell dyed in the primary antibody and the second antibody the separation is performed after washing to the flow cytometer.

The human fat origin of organization adult stem cell according to the present invention, and composition containing fibroblast and fat enhance the skin firmness. Skin improves to the wrinkle, especially, the fate wrinkle of face and middle of the forehead wrinkle and skin droop. And it is effective for the cosmetic effects by being restored the cavity through the molding. And the hu

man fat origin of organization adult stem cell is useful in the composite according to the present invention is the breast tissue formation etc. it can specialize in the fat cell.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

#### 실시예 1 : 지방조직에서 다분화능 성체 줄기세포의 분리 및 성형용 조성물의 제조

##### 제조예 1

인간 지방조직의 지방흡입술(liposuction)에서 부수적으로 얻어지는 생리식염수에 부유된 지방함유 suspension을 적정량의 생리식염수로 고르게 재부유하여 세포배양용 flask 또는 roller bottle에 적당량을 넣은 다음, 정치 배양 또는 회전배양을 하였다. 정치 배양의 경우, 최소 6시간 내지 12시간 동안 정치하였다. 그 다음으로, 플라스틱 표면에 부착되는 세포층(지방유래 MSC, fibroblast)을 트립신으로 처리하여 회수하였다(도 1). 이때, 소량의 생리식염수에 부유된 것을 직접 회수하여 바로 사용하거나, 세포층의 부피를 줄이고자 할 경우, 상기 생리식염수로 회수한 세포층을 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 가라앉은 펠렛층만을 사용하였다. 상기 분리된 세포층에는 성체줄기세포와 섬유아세포가 함유되어 있다. 상기 분리된 세포층을 지방과 혼합하여 본 발명에 따른 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제조하였다.

##### 제조예 2

인간 지방조직으로부터 다분화능 줄기세포를 분리 및 정제하였다. 즉, 분리된 인간 지방조직을 PBS로 3번 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후, collagenase type1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM-LG(low glucose) 배지를 이용해 지방과 DMEM을 1:3의 비율로 혼합하여 37℃에서 1시간 동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 1:1로 혼합한 10% FBS와 DMEM-LG(low glucose)로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 $\mu$ m mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 인큐베이션하였다. 하룻밤 지난 후 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, K-NAC media(Keratinocyte-SFM media + 2mM NAC + 0.2mM ascorbic acid + 0.09mM calcium + 5ng/ml rEGF + 50 $\mu$ g/ml BPE + 5 $\mu$ g/ml insulin + 74ng/ml hydrocortisone)를 2일마다 교체하면서 배양하여 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포 및 섬유아세포액을 수득하였다. 상기 수

Hereinafter, the invention tries to be more particularly explained through the embodiment. It has to a person skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry to the scope of the present invention be limited by these embodiments and not be interpreted as these embodiments only exemplify the invention.

embodiment 1: the manufacture of the separation of multipotent adult stem cell and composition for molding in the adipose tissue.

##### Manufacturing example 1.

In the liposuction of the human adipose tissue, after the saturated fat suspension floated in the incidentally obtained saline solution was re-floated evenly to the saline solution of the optimal amount and the appropriate amount was put into the flask for the cell culture or the roller bottle the stationary culture or the roller tube culture was done. In case of the stationary culture, it assumed the minimum of 6 hours to 12 hours. Next, cell layer (the fat originated MSC, and the fibroblast) adhered to the flask surface were processed as trypsin and it collected (fig. 1). At this time, it directly collected to be floated in a small amount of saline solution and it immediately used or when the volume of the cell layer tried to be reduced it used only the pellet layer which for 10 minutes centrifuged the cell layer which collected to the saline solution in 1000rpm and was settled. In the separated cell layer as described above, the adult stem cell and fibroblast are contained. The adult stem cell according to the invention mixing the separated cell layer as described above with the fat, and the fibroblast and fat or the skin care or the composition for molding containing the fat cell were manufactured.

##### Manufacturing example 2.

The Multipotent stem cell was refined from the human adipose tissue with the separation. That is, the separated human adipose tissue may be referred to the digestion for 1 hour in 37℃ using the DMEM-LG (low glucose) culture medium with the collagenase type1 (1mg/ml) the organization is small pieces cut it washes to PBS with three times, the fat and DMEM are mixed at a ratio of 1:3. In 1000rpm after PBS washing, it centrifuged at for 5 minutes. It centrifuged for 5 minutes at 1000rpm to 10% FBS and the DMEM-LG (low glucose) which the pellet in which the supernatant remained in the suction and bottom surface mixed to 1:1 after doing was hinged. After filtering in 100 $\mu$ m mesh and removing the debris it washed to PBS. It incubated in the DMEM (10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) culture medium. Cells which did not stick after passing one night washed to PBS. While replacing the K-NAC media (Keratinocyte-SFM media + 2mM NAC +

득된 세포에 지방을 혼합하여 본 발명에 따른 성체 줄기세포, 섬유아세포 및 지방 또는 지방세포를 함유하는 피부 미용 또는 성형용 조성물을 제조하였다.

0.2mM ascorbic acid + 0.09mM calcium + 5ng/ml rEGF + 50µg/ml BPE + 5µg/ml insulin + 74ng/ml hydrocortisone) at 2 it cultivated and the human adipose tissue originated Multipotent stem cell and fibroblast liquid were obtained. The adult stem cell according to the invention mixing the fat with the obtained cell as described above, and the fibroblast and fat or the skin care or the composition for molding containing the fat cell were manufactured.

실시예 2: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 면역학적 특성

embodiment 2: the immunological characteristic of the fat originated multipotent stem cell.

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 성체 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 2% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 sample수 만큼 1 #215 #105 cells을 분주한 후 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 150µl의 블로킹용액 (5% FBS in PBS)을 넣은 후 잘 혼합하여 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거하고, 100µl의 블로킹용액 (5% FBS in PBS)을 넣은 후 잘 혼합하여 4℃에서 30분동안 반응시켰다. 다시 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리한 후, 상층액을 제거하고, 150µl의 블로킹용액(5% FBS in PBS)을 넣은 후 잘 혼합하고, 각 well에 antibody(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 4℃에서 30분동안 반응시켰다. 반응 후에 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분동안 4℃에서 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분동안 4℃에서 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 200µl의 PBS에 잘 섞은 후 1% paraformaldehyde를 넣어서 single하고, 플로우 사이토미터를 이용하여 분석하였다.

The obtained adipose tissue originated adult stem cell was washed in the embodiment 1 to PBS. After trypsinizing the cell was taken away and it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes in 4℃. After throwing the supernatant away the mixed solution of PBS and 2% FBS was filled and the mixed solution centrifuged at 1000rpm after doing washing for 5 minutes in 4℃. After throwing the supernatant away the cell was floated in PBS and after being busy 1 × 10<sup>5</sup> cells was centrifuged at 1000rpm as the sample number for 5 minutes in 4℃ the supernatant was removed and after putting the blocking solution (5% FBS in PBS) of 150µl the blocking solution (5% FBS in PBS) mixed and the blocking solution (5% FBS in PBS) centrifuged at 1000rpm for 5 minutes in 4℃. Again, the supernatant was removed. After putting the blocking solution (5% FBS in PBS) of 100µl the blocking solution (5% FBS in PBS) mixed and the blocking solution (5% FBS in PBS) reacted at 4℃ for 30 minutes. Again, after it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes in 4℃ the supernatant was removed. The blocking solution (5% FBS in PBS) mixed after putting the blocking solution (5% FBS in PBS) of 150µl. The antibody (R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) was put into each well. The blocking solution (5% FBS in PBS) reacted at 4℃ for 30 minutes. It centrifuged at 1000rpm after reaction for 5 minutes in 4℃. After removing the supernatant it washed to PBS and it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes in 4℃. Again, it washed to PBS and the process of centrifuging was repeated after the supernatant removal in 1000rpm for 5 minutes in 4℃. After well mixing PBS of 200µl after removing the supernatant 1% paraformaldehyde was put and it analyzed using single and flow cytometer.

지방유래 줄기세포의 표면항원분석(FACS analysis)

The surface antigen analysis of the adipose derived stem cell(FACS analysis)

Antigen	AD-MSCs
CD73	+
CD90	+
CD29	+
CD44	+
CD105	+
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

Antigen	AD-MSCs
CD73	+
CD90	+
CD29	+
CD44	+
CD105	+
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

그 결과, 표 1에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 지방조직 유래 성체 줄기세포는 CD73에 대해서는 91%, CD90에 대해서는 97%, CD29에 대해서는 96%, CD44에 대해서는 83%, CD105에 대해서는 80%의 양성반응을 보였다. 또한, 다른 항원에 대한 면역표현형을 확인한 결과, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내었다.

### 실시예 3: 지방조직 유래 줄기세포의 면역염색분석

상기 실시예 1에서 수득된 지방조직 유래 줄기세포를 PBS로 세 번 세척하고, 4% paraformaldehyde을 함유한 PBS로 30분간 고정하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 0.1% Triton-X100을 함유한 PBS로 10분간 침투(permeabilization)시킨다. PBS로 세 번 세척한 후, 10% NGS로 1시간동안 반응시키고, 1차항체를 함유한 PBS에 하룻밤동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 2차항체로 암실에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후, mounting하였다.

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 스피어는 미분화상태의 세포 마커라고 할 수 있는 Oct4 및 중간엽 줄기세포의 마커인 SH2(CD105), SH3/4(CD73)에 대하여 양성반응을 나타내었다.

### 실시예 4: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화

실시예 1에서 수득한 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포를 5% FBS, 1#956#M dexamethasone, 200#956#M indomethacin, 10 $\mu$ g/ml insulin, 0.5mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)을 함유한  $\alpha$ -MEM 배지에서 2주동안 배양하여 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

### 실시예 5: 지방 유래 다분화능 줄기세포를 이용한 동물 실험

마우스를 이용하여, 지방조직 유래 줄기세포의 지방 부피 보존능을 확인하였다. 마우스는 실험군 12 마리와 대조군 12마리를 사용하였으며, 실험군에는 지방1ml와 실시예 1에서 분리된 지방조직 유래 다분화능 성체 줄기세포 및 섬유아세포(5#215#105/200#956#I saline)를 마우스에서 피하지방이 없는 부위인 두부피하에 주입하였으며, 대조군에는 지방1ml+vehicle(200ul saline)을 주입하였다.

Consequently, as shown in it showed up in the table 1 the adipose tissue originated adult stem cell of the present invention showed the positive reaction of 80% on the CD73 on 91%, and the CD90 on 97%, and the CD29 on 96%, and the CD44 on 83%, and the CD105. Moreover, the immunophenotype about the other antigen was confirmed. Then the immunological characteristic of voice was altogether shown about the CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 and HLA-DR.

### embodiment 3: the immunostaining analysis of the adipose tissue-originated stem cell.

The obtained adipose tissue-originated stem cell was washed in the embodiment 1 to PBS with the severn. It fixed on 30 min. to PBS containing 4% paraformaldehyde. 0.1% Triton-X100 is forced in PBS after doing the severn washing through PBS contained with for 10 minutes penetration (permeabilization). It reacts by 10% NGS to PBS after doing the severn washing for 1 hour. It reacts in PBS containing the primary antibody for one night. It washed to PBS with 3 time. It reacted in the dark room by the secondary antibody for 1 hour. PBS should be the mounting after doing the severn washing.

Consequently, as shown in figure 2, the Multipotent stem cell sphere according to the present invention exhibits the SH 2 (CD105) called the marker of the mesenchyme stem cell and the Oct4 which it can be called the cell marker of the undivided condition, and the positive reaction about the SH 3/4 (CD73).

### embodiment 4: the differentiation to the fat cell of the fat originated multipotent stem cell.

The adipose tissue originated multipotent adult stem cell obtained in the embodiment 1 was cultivated in  $\alpha$ -MEM culture medium containing 5% FBS, 1 $\mu$ M dexamethasone, 200 $\mu$ M indomethacin, 10 $\mu$ g/ml insulin, 0.5mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) for 2 weeks and the differentiation to the fat cell of the Multipotent stem cell was induced. It analyzed using the Oil red O dyeing method. Consequently, as shown in figure 3, it could confirm that the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention was specialized to the fat cell.

### embodiment 5: the animal experiment using fat originated multipotent stem cell.

The local district blood preservation ability of the adipose tissue-originated stem cell was confirmed using the mouse. It injected into head subcutaneousness called the site without the subcutaneous fat the fat 1ml in the experimental group and the adipose tissue originated multipotent adult stem cell separated from the embodiment 1 and fibroblast (5 $\times$ 10<sup>5</sup>(SP)5(/SP)/200 $\mu$ l saline) in the mouse the mouse used the experimental group 12 numbers a

nd control group 12 numbers. And the fat 1ml+ vehicle (200ul saline) was injected in the control group.

15일이 경과한 후, 마우스의 두피를 절개하여 지방을 떼어낸 후, 부피를 측정하였다. 그 결과, 대조군에서는 주입한 지방부피가 31%로 축소된 반면, 실시예 1에서 제조한 조성물을 함께 주입한 실험군에서는 주입한 지방 부피의 45%가 유지되었다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 지방조직 유래 줄기세포와 섬유아 세포는 지방 이식술에서 발생하는 지방 부피 저하를 상당히 감소시키는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

After 15 passed after the scalp of the mouse was cut out and the province was removed the volume was measured. Consequently, in the control group, whereas the local district blood injected was reduced to 31% 45% of the local district blood injected in the experimental group which together injected the composition manufactured from the embodiment 1 was maintained. It could confirm that it had the effect that considerably reduced the local district blood degradation in which the adipose tissue-originated stem cell according to the present invention and fibroblast were generated from this result in the fat transplant.

### 도면에 대한 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포, 섬유아세포 등을 포함한 플라스크에 부착하는 세포를 100배 배율로 촬영한 사진이다.

도 2는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 함유 MEBM 배지에서 sphere culture한 후 면역염색을 이용하여 Nestin, Oct4, SH2, SH3/4가 발현한 결과를 100배 배율로 나타낸 사진이다.

도 3은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 지방세포를 200배 배율로 나타낸 것이다 (A: 분화된 상태의 phase contrast, B: Oil Red O 염색법으로 염색한 것).

### Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph taking a picture of the cell for attaching the human adipose tissue originated Multipotent stem cell, the fibroblast etc to the flask included with the hundredfold magnification according to the invention.

Figure 2 is a photograph showing the result that the Nestin, the Oct4, the SH2, the SH3/4 reveals the human adipose tissue originated Multipotent stem cell in the CORM-2 containing MEBM culture medium after doing the sphere culture using the immunostaining in terms of the hundredfold magnification according to the invention.

The fat cell specialized from the human adipose tissue originated Multipotent stem cell according to the present invention is shown fig. 3 in 200 ship magnification (a: it dyes to the phase contrast of the specialized state, and the B: Oil Red O dyeing method).

### 면책안내

본 문서는 특허 및 과학기술문헌 전용의 첨단 자동번역 시스템을 이용해 생성되었습니다. 따라서 부분적으로 오역의 가능성이 있으며, 본 문서를 자격을 갖춘 전문 번역가에 의한 번역물을 대신하는 것으로 이용되어서는 안 됩니다. 시스템 및 네트워크의 특성때문에 발생한 오역과 부분 누락, 데이터의 불일치등에 대하여 본원은 법적인 책임을 지지 않습니다. 본 문서는 당사의 사전 동의 없이 권한이 없는 일반 대중을 위해 DB 및 시스템에 저장되어 재생, 복사, 배포될 수 없음을 알려드립니다.

(The document produced by using the high-tech machine translation system for the patent and science & technology literature. Therefore, the document can include the mistranslation, and it should not be used as a translation by a professional translator. We hold no legal liability for inconsistency of mistranslation, partial omission, and data generated by feature of system and network. We would like to inform you that the document cannot be regenerated, copied, and distributed by being stored in DB and system for unauthorized general public without our consent.)