

Bibliographic Data

Int.Cl.	A61K 35/12 A61K 38/30 A61K 31/375 A61K 9/08
Application No.	1020130055158
Application Date	20130515
Unexamined Publication No.	1020140134994
Unexamined Publication Date	20141125
Requested Date of Examination	20140417
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	RA,JUNG-CHAN Kang, Sung Keun Jo, Jung Youn

발명의 명칭

정맥 투여용 줄기세포 조성물

Title of Invention

Vein medication stem cell composition.

요약

본 발명은 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 정맥 투여에 적합한 줄기세포 조성물을 제공할 수 있어, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 안정적으로 표적 조직에 도달하여 활성을 나타내는 효능을 보다 효율적으로 높일 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

Abstract

The invention relates to the vein medication stem cell composition which has the diameter of 10 through 20 μm and it has the stem cell existing as the single cell as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml done.

According to the invention, the cytotherapy effect using the stem cell the stem cell composition which is suitable for the intravenous administration can be provided can be conspicuously made promoted.

청구의 범위

청구 1항:

10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

Scope of Claims

Claim 1:

The vein medication stem cell composition which it has the diameter of 10 through 20 μm ; and it has the stem cell existing as the single cell as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml it does.

청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 직경이 10 내지 15 μm 인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

Claim 2:

As for claim 1, the vein medication stem cell composition called in the stem cell, the diameter 10 through 15 μm .

청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 혈관 내 투여에 적합한 직경을 가지는 줄기세포는 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아소코

Claim 3:

As for claim 1, the vein medication stem cell composition which cultivates in the culture medium con

르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 배양하여 수득하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 4항:

제3항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture) (GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장 배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 5항:

제3항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄, 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 6항:

제5항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 7항:

제3항에 있어서, 상기 배지는 FBS (fetal bovin serum) 또는 칼슘을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 8항:

제3항에 있어서, 배양된 줄기세포를 트립신으로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 9항:

제3항 또는 제8항에 있어서, 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

청구 10항:

taining the component in which the stem cell having the diameter which is suitable for inside of the blood vessel the administration is selected in group comprised of the basal medium and NAC (N-acetyl-L-cysteine), ascorbic acid (ascorbic acid), and insulin or the insulin pseudo element, hydrocortisone, dexamethasone, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol), the EGF (epidermal growth factor) and antioxidant more than 2 kinds and obtained.

Claim 4:

As for claim 3, the vein medication stem cell composition selected from group comprised of the basal medium is the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO), the MEM-alpha culture medium (GIBCO), and the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Welgene), MCDB 131 culture medium (Welgene), IMEM culture medium (GIBCO), K-SFM, DMEM / F12 culture medium, PCM culture medium and MSC expansion culture medium (Chemicon).

Claim 5:

As for claim 3, the vein medication stem cell composition selected from group comprised of the antioxidant is the selenium, ascorbic acid, vitamin E, catechin, lycopene, beta-carotene, coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexanoic acid).

Claim 6:

As for claim 5, the vein medication stem cell composition called the antioxidant is selenium.

Claim 7:

As for claim 3, the vein medication stem cell composition in which the culture medium additionally contains the FBS (fetal bovin serum) or calcium.

Claim 8:

As for claim 3, the vein medication stem cell composition which further comprises the step of processing as trypsin the cultivated stem cell.

Claim 9:

As for claim 3 or 8, the vein medication stem cell composition which further comprises the step of floating in the aspirin contain solution the cultivated stem cell.

Claim 10:

제9항에 있어서, 상기 아스피린 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

As for claim 9, the vein medication stem cell composition containing the solution selected from group comprised of the aspirin contain solution is the saline solution, and the Hartmann -D solution and PBS (Phosphate Buffered Saline).

청구 11항:

Claim 11:

제9항에 있어서, 상기 아스피린은 이소소르비드 기재 아스피린 또는 니코틴산 기재 아스피린 화합물 중에서 선택되는 것인 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

As for claim 9, the vein medication stem cell composition selected from the aspirin is the isosorbide basic material aspirin or the nicotinic acid basic material aspirin compound.

청구 12항:

Claim 12:

제9항에 있어서, 상기 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

As for claim 9, the vein medication stem cell composition called the content of the aspirin is 0.0001 through 0.01 mg/ml.

청구 13항:

Claim 13:

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

As for claim 1, the vein medication stem cell composition called the stem cell is the adult stem cell.

청구 14항:

Claim 14:

제13항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물.

As for claim 13, the vein medication stem cell composition called the stem cell is the adipose tissue originated mesenchyme stem cell.

청구 15항:

Claim 15:

하기 단계를 포함하여, 10 내지 20 μ m의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제조하는 방법:

A method comprising the steps of: including the following stage; having the diameter of 10 through 20 μ m; and has the stem cell which exists as the single cell as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml manufacturing the vein medication stem cell composition which does: the step of processing the trypsin in the stem cell cultivated in the step :

(a) 지방조직 또는 상피조직 유래의 성체 줄기세포를 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 배양하는 단계;

(b) (a) step cultivated in the culture medium contained and it obtains: the step of has the step :

(b) 상기 (a) 단계에서 배양하여 수득한 줄기세포에 트립신을 처리하는 단계;

(d) which floats the stem cell which processes in the aspirin contain solution and the stem cell which obtains in (c) step as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml manufacturing the vein medication stem cell composition which does the trypsin in the stem cell cultivated in

(c) 상기 (a) 단계에서 배양하여 수득한 줄기세포 또는 (b) 단계에서 트립신을 처리한 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계; 및

(c) (a) step and it obtains or (b) step in group comprised of the basal medium: and NAC (N-acetyl-L-cysteine) the adult stem cell of

(d) (c) 단계에서 수득한 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 정맥투여용 줄기세포 조성물을 제조하는 단계.

(a) adipose tissue or the epithelial tissue originated, ** acid (ascorbic acid), and insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, the dexamethasone, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol), the EGF (epidermal growth factor) and antioxidant.

기술분야

본 발명은 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 줄기세포 및 부형제를 함유하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 있어서, 상기 줄기세포는 혈관 내 투여에 적합한 직경을 가지고, 단세포로 존재하며, 농도는 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml인 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것이다.

배경기술

줄기세포(stem cell)는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직 손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.

성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다. 특히, 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복을 위해 세포를 적극적으로 활용하여 실시하는 치료법인 재생 의료에 있어서, 환자 본인으로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하는 단계, 시험관 배양으로 세포 증식 및/또는 분화를 유도하는 단계, 및 선택된 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포를 착상에 의해 환자 자신의 몸에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이처럼, 기존의 고전적인 약물치거나 수술적 방법을 통한 질병치료가 손상된 세포#183#조직#183#장기를 건강한 것으로 바꾸는 세포#183#조직대체치료를 전환될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

Technical Field

The invention relates to the vein medication stem cell composition called the concentration is $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml it exists as the single cell it has the diameter in which the stem cell is suitable for inside of the blood vessel the administration as to the vein medication stem cell composition containing stem cell more detailed as the vein medication stem cell composition and the diluting agent.

Background Art

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability. And it can classify into the pluripotent stem cell (totipotent stem cell), the pluripotent stem cell, and the Multipotent stem cell. The pluripotent stem cell (totipotent stem cell) has the property thereafter that the cell to 8 cell group is like that with the correction of one complete entity the cell having the property of the pluripotent which can be generated the ovum and correct letter. And if this cell is separated and it transplants to the womb it can be generated as one complete entity. The pluripotent stem cell is that the new life it is derived from the positioned inner cell mass it is this specialized to various other histiocytes is formed in the inside of the blastocyst which is the cell which can be generated by the ectoderm, the mesoderm, and the various cells and organization of the endoderm layer originated and shows up after the correction 4~5. The fetal life, and the regeneration in the maintenance of homeostasis of the adult tissue as well as the growth of each organization of the new-born baby and adult phase and long-term and development and tissue injury it is the stem cell specializing in the cell specific for the organization containing the Multipotent stem cell is this cell and boiler may be referred to the adult stem cell while engaging in the function of inducing tissue specific pluripotent cells are called collectively.

There can be the specialized characteristic as the specific tissue the stem cell is developed the cell in which the adult stem cell already exists in all kinds of the long-terms of the human body is picked. But recently, the adult stem cell is used. The experiment let differentiate as all kinds of different organization including the interstitial cell etc. gets the success and the experiment is watched. Particularly, as to the regeneration medical called the therapy which actively utilizes the cell for the regeneration of the biological tissue falling into malfunction by bottle or accident or the incompatibility and long-term and function recovery and performed, the method for including the step of collecting the stem cell from the patient oneself, and the blood originated monocyte or the bone marrow originated monocyte, and the step of inducing the tube culture the cell proliferation and/or the differentiation and step of introducing to the condition of the patient oneself with the implantation the pulverization (the stem cell and/or the precursor cell) and/or the selected differentiated cell is very much used. Like this, it is predicted to be converted to the cell organization substitution value cure which with being fi

ne changes the cell · organization · long-term when the treatment of illness through the classical drug treatment or the surgical method is damaged. In that way the availability of the stem cell is more enhanced.

이에, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 세포치료기술이 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 개선하기 위한 기술이 개발되고 있다 (WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호, Leu, Steve Lin et al., Journal of translational medicine, 8 (1):63, 2010; Kim, J.M. et al., Brain research, 1183:43, 2007, Kim, Young-Ki et al., Journal of veterinary clinics, 28:122, 2011; Park SS. et al., Cytotherapy, 14 (5):584, 2012; Soo-Kyung Kang et al., Stem Cells and Development, 15(4):583, 2006). 줄기세포는, 관절염, 퇴행성 관절염 등과 같이 손상부위에 직접 주입하여 치료효과를 기대할 수도 있지만 줄기세포를 정맥에 투여할 수도 있다. 정맥을 통하여 투여되는 줄기세포는 손상된 장기 등의 손상된 신체 내부로 직접 전달되어 손상 부위를 치료하는 효과를 나타낼 수 있으므로 신경계 질환, 알츠하이머, 암, 당뇨, 류마티스 등의 다양한 질병에 대한 치료효과를 나타낼 수 있을 것이라 예상된다.

Thus, presently, while the cell therapy technique using the mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cells) it is studied of the various functions of the stem cell begins to receive the foot light it develops the technology (WO 2006/019357, KR0795708 B, KR0818214 B, leu, Steve Lin et al, journal of translational medicine, 8 (1) :63, 2010: Kim, J M. et al, brain research, 1183:43, 2007, kim, young-Ki et al, journal of veterinary clicics, 28:122, 2011: Park SS. et al, cytotherapy, 14 (5) :584, 2012: Soo-Kyung Kang et al., Stem Cells and Development, 15 (4) :583, and 2006) for improving the mesenchyme stem cell separated from the human body in order to be suitable for the treatment the stem cell directly injects into the lesion mouth like the arthritis, the degenerative arthritis etc. and the therapeutic effect can be expected but the stem cell can be administered to the vein. Because of be able to showing the therapeutic effect toward the various diseases of the nervous system disease, alzheimer, cancer, diabetes, the rheumatic etc since showing the effect that is delivered to the damaged inside of the body including the long-term etc. and the stem cell injected through the vein is damaged cures the damage part the effect is expected.

그러나, 혈관 내 투여에 적합한 줄기세포 조성물을 제조하는 방법에 대한 기술은 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.

But the stem cell composition which is suitable for inside of the blood vessel the administration may be referred to the technology about the method, for manufacturing so far, the research is the unsatisfactory condition.

이에, 본 발명자들은 표적 부위에 안정적으로 도달하여 목적하는 치료효과를 나타낼 수 있는 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 정맥 내로 투여되기 전 줄기세포가 파쇄되거나 응집되지 않고, 정맥 투여에 적합한 직경을 가지며 단세포 형태임과 동시에 치료효과를 나타내기에 적합한 수의 줄기세포를 함유하는 정맥투여용 줄기세포 조성물을 개발하고 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, the inventors has the diameter which makes many efforts in order to develop the vein medication stem cell composition reaching the target site and can show the intended the therapeutic effect and then the stem cell is crushed or it is not cohered before being injected within the vein and is suitable for the intravenous administration. And the vein medication stem cell composition containing the stem cell which was suitable to show the therapeutic effect with being the single cell form of the number was developed and the invention was completed.

발명의 내용

Summary of Invention

해결하고자 하는 과제

Problem to be solved

본 발명의 목적은 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제공하는데 있다.

This Purpose of the invention is to provide the vein medication stem cell composition.

과제 해결 수단

Means to solve the problem

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.

To accomplish the above objects, the present invention is to provide the vein medication stem cell composition which has the diameter of 10 through 20 μm and it has the stem cell existing as the single cell as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml done.

발명의 효과

Effects of the Invention

본 발명에 따른 정맥투여용 줄기세포 조성물은 정맥 투여시 혈관이 전혀 막히지 않으면서 손상부위에 줄기세포를 전달하므로 우수한 치료효과를 나타낼 수 있어 줄기세포의 혈관 내 투여에 의한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

Since the blood vessel is not choked in the intravenous administration at all and the vein medication stem cell composition according to the present invention delivers the stem cell to the damage part the excellent therapeutic effect can be shown and the cytotherapy effect by inside of the blood vessel the administration of the stem cell can be conspicuously made promoted.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

Description of Embodiments

달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에서 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

Differently, technical scientific terminologies which defined are used in this specification has the meaning it is understood in the technical field in which the invention belongs with the unskilled expert of being identical. Generally, hereinafter the experimental method is well known with the glossology used in this specification in his technical field and generally it is used.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#줄기세포(stem cell)#34#란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, #34#성체 줄기세포#34#는 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체 단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.

In the present invention, while having the self copy ability the term " stem cell " used means the step that each long-term of the embryo bud it is progressed it is formed or the stem cell showing up in the adult step the cell having the capability specializing to two or more cells.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#중간엽 줄기세포#34#는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 신경 유래 중간엽 줄기세포, 피부 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.

In the present invention, it is the divided stem cell which the term " mesenchyme stem cell " used separates from the organization of human or the mammal. It can be derived from various organizations. Particularly, it can be the umbilical cord originated mesenchyme stem cell, umbilical cord blood originated mesenchyme stem cell, bone marrow originated mesenchyme stem cell, fat originated mesenchyme stem cell, muscle originated mesenchyme stem cell, nerve originated mesenchyme stem cell, skin derivation mesenchyme stem cell, amnion originated mesenchyme stem cell and placenta originated mesenchyme stem cell. And the technology separating the stem cell from each organization experiences and the technology is known to have in the business field.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#지방 조직 유래 중간엽 줄기세포#34#란 지방조직에서 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에 축약하여 "지방 유래 성체 줄기세포", "지방 줄기세포" 또는 "지방 유래 줄기세포"라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통하여 수득할 수 있는데, 그 분리 방법은 예를 들어 다음과 같을 수 있다. 즉, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접 회수하거나 하는 방법 등을 통해 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다.

In the present invention, as the divided adult stem cell which the term " fat origin of organization mesenchyme stem cell " used separates from the adipose tissue, it reduces in this specification "fat originated adult stem cell". It names as "adipose stem cell" or "adipose derived stem cell". It can obtain through the normal method in which this is known in the relevant industry. The separation method can be the same as that of for example, the next. That is, it collects after processing the stem cell layer adhered to the culture vessel including the flask etc. the saturated fat suspension floated in the saline solution obtained from the liposuction is cultivated as trypsin or the fat originated mesenchyme stem cell can be separated through the method etc. It directly collects to scratch by the scraper and be floated in a small amount of saline solution or it does.

본 발명에서 "혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포"란 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 흐름이나 순환을 방해하지 않으면서 표적 조직으로 용이하게 이동하여 그 활성을 나타낼 수 있도록 직경이 정맥의 직경에 비하여 작은, 바람직하게는 직경이 10 내지 20 μm 인 줄기세포, 더욱 바람직하게는 직경이 10 내지 15 μm 인 줄기세포를 의미한다.

In the present invention, stem cell called preferably, the diameter is 10 through 20 μm in which the diameter is small in comparison with the diameter of the vein so that it does not disturb inside of the blood flow the flow or circulation and the injected stem cell easily moves to the target tissue and "the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the admi

nistration" show the activity within the blood vessel, and the stem cell called more preferably, the diameter is 10 through 15 μm are meant.

본 발명에서, "이송"이란 줄기세포 자체 또는 줄기세포를 함유하는 용액을 담은 용기 등을 자동차 등의 교통수단에 의하여 운송하는 것을 의미하며, "보관"은 실온에서 보관하는 것 이외, 냉장에서의 보관도 포함한다.

In the present invention, "transfer" further includes the except, and the storage at the cooling "storage" keeps in the room temperature it means to carry the contained vessel etc. the stem cell itself or the solution containing the stem cell with the public transportation including the vehicle etc.

본 발명에서, "줄기세포의 파쇄 및 응집 방지"는 단세포 형태의 줄기세포가 깨지거나 응집됨 없이 그 형태를 유지하는 것을 의미하는 것으로, 일 예로 이송이나 보관 중 줄기세포의 세포막이 깨지거나 세포 간 응집 (aggregation)이 형성되지 않고 단세포 (single cell) 형태를 유지하는 것을 의미할 수 있다.

In the present invention, it means to the stem cell of the single cell form become broken or "the fracturing and cohesion prevention of the stem cell" are cohered peculiarly maintain the form. For example, it can mean to the cell membrane of the stem cell become broken or the coherence (aggregation) which the cell goes not be formed among the transfer or storage and maintain the single cell form.

줄기세포는 다양한 방법, 예를 들면, 정맥내, 동맥내 또는 복강내 투여 등의 방법으로 신체 내로 투여될 수 있는데 그 중에서도 정맥 투여는 외과적 수술 없이도 간편하면서도 안전하게 질병을 치료할 수 있어 유용하다. 그러나 정맥 내로 투여된 줄기세포가 실제로 표적 부위에 안정적으로 도달하여 목적하는 치료효과를 나타내기 위해서는 여러 가지 요건이 만족되어야 한다.

It can be injected to the method including the intraarterial or the intraperitoneal administration etc. within the body but even when being convenient the disease can be among them safely cured by as to the intravenous administration, without the surgical operation and the stem cell is useful within the various method, for example, the vein. But in order to the injected stem cell steadily reach the target site within the vein in fact and show the intended therapeutic effect various requisites have to be satisfied.

먼저, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않도록 혈관 내 투여에 적합한 크기여야 한다. 다양한 조직에서 유래될 수 있는 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cell)는 환자나 그 유래, 배양 상태나 방법에 따라 형태나 증식 정도가 제각각이며 그 크기도 직경이 약 10 내지 300 μm 으로 다양하다. 그러나 인간의 후모세관 정맥 (post-capillary venules)은 대략 그 직경이 20 내지 50 μm 이며, 소동맥은 직경이 10 내지 30 μm 이고 (Schmidt GT, 1989), 모세혈관은 직경이 10 μm 내외로 (Schmidt GT, 1989; Chien, 1975; John Ross, 1991; Herbert et al., 1989; Arthur and Guyton, 1997; Renkin, 1989; Gaehtgens, 1980; Row 1979), 보통의 중간엽 줄기세포의 직경보다 작다. 따라서, 상대적으로 크기가 큰 중간엽 줄기세포가 정맥 내로 투여되면 혈관 내 활성에 영향을 줄 수 있다. 구체적으로, 혈류 속도를 감소시킬 수 있을 뿐 아니라, 혈액 순환을 방해하여 혈류의 중단, 혈전 형성, 혈관 폐색, 심지어 사망을 유발할 수 있다는 문제점이 있다. 이와 관련하여, 직경이 약 20 내지 53 μm 인 중간엽 줄기세포를 마우스에 정맥 투여시 혈류 속도가 감소되었고, 심근 경색, 혈전 형성의 유발이 관찰되었다는 보고가 있다 (D. Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 적합한 크기의 줄기세포를 혈관 내에 투여하는 것이 중요하다.

Firstly, the stem cell injected within the blood vessel is inside of the blood flow the speed may be referred to the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration in order to reduce or it does not form the blood clot. The form or the proliferating rate is the various and the mesenchyme stem cell (Mesenchymal stem cell) originating in various organizations the size the diameter is various according to the patient or the originated, and the culture state or the method to about 10 through 300 μm . But the high endothelial venule (post-capillary venules) of human is smaller than in the capillary vessel, the diameter 10 μm in and out (Schmidt GT, 1989; Chien, 1975; John Ross, 1991; Herbert et al., 1989; Arthur and Guyton, 1997; Renkin, 1989; Gaehtgens, 1980; Row 1979), normal, the diameter of the mesenchyme stem cell the diameter as to the arterioles, is 10 through 30 μm (Schmidt GT, 1989) approximately the diameter is 20 through 50 μm . Therefore, relatively, size can affect the blood vessel skid resistant if the large mesenchyme stem cell is injected within the vein. Specifically, the blood flow rate can be reduced. In addition the circulation of the blood is disturbed and it has the abort, the thrombogenicity, the occlusion from blood vessel of the blood flow, and the problem that it even can cause death. The blood flow rate was the mesenchyme stem cell called the diameter in connection with this, is about 20 through 53 μm reduced in the mouse in the intravenous administration. It has the report (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376) that the myocardial infarction, and the induction of the thrombogenicity were observed the report (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376) is important to administer the stem cell of the suitable size within the

he blood vessel.

또한, 혈관 내로 투여되기 전 줄기세포는 파쇄되거나 응집 (aggregation)의 형성이 없어야 하며, 혈관 내로 투여된 후에도 단일 세포 (single cell)로서 세포의 파괴나 응집의 형성 없이 표적 부위에 안정적으로 도달하여야 한다. 신체 내 투여를 위하여 줄기세포에 트립신 등을 처리하여 단세포 형태로 제조할 수 있지만 단세포 형태로 제조된 줄기세포라 하더라도 이송이나 보관 중 세포막이 깨지거나 세포 간 응집 (aggregation)이 형성되는 문제점이 있다. 단세포 (single cell) 형태가 아닌 응집된 줄기세포 또는 깨진 세포는 정맥 투여 등의 방법으로 신체에 투여되는 경우, 혈관 내피세포나 혈소판 등과 부착하여 혈류 속도를 감소시키거나 혈액 순환을 방해할 수 있으며 심지어 미세기관이나 혈관 등의 폐색을 초래할 수도 있다 (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 혈관 내로 투여되기 전 세포가 파쇄되거나 응집 (aggregation)이 형성되지 않아야 하며, 혈관 내로 투여된 후에도 단일 세포 (single cell)로서 세포의 파괴나 응집의 형성 없이 표적 부위에 안정적으로 도달하여야 한다.

Moreover, before being injected within the blood vessel the stem cell is crushed or there has to be no formation of the coherence (aggregation). And it steadily has to reach the target site as the single cells without the formation of the break down of the cell or coherence even after being injected within the blood vessel. There is a problem that the coherence (aggregation) which the cell membrane becomes broken among the transfer or storage or the cell goes although it says to be the stem cell processing trypsin etc. for inside of body the administration in the stem cell and can manufacture in the form of the single cell but is manufactured in the form of the single cell is formed. The cohered stem cell which is not single cell form or the broken to pieces cell has the coherence (aggregation) including the case, of being injected the blood vessel endothelial cell or the platelet etc. the cell is crushed to the therefore it is injected within the blood vessel the block including the fine paper pipe or the blood vessel etc. can be even caused (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376) the circulation of the blood can be disturbed the blood flow rate is reduced it adheres in the method body including the intravenous administration etc. And it steadily has to reach the target site as the single cells without the formation of the break down of the cell or coherence even after being injected within the blood vessel.

뿐만 아니라, 표적 부위에 도달한 줄기세포가 목적하는 치료효과를 나타내도록 일정 농도 이상의 세포 투여가 전제되어야 한다. 따라서, 임상적으로 적용하고자 하는 줄기세포를 대량으로 수득하는 것이 중요하다.

Besides, the cell administration more than the constant concentration has to be premised so that the stem cell reaching the target site show the intended therapeutic effect. Therefore, it is important to obtain the stem cell to clinically apply by the massively.

따라서 본 발명은 혈관 내로 투여되기 전 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지하여 신체 내 투여에 적합하며, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가져서 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않으므로 안정적으로 치료효과를 나타내는, 안전성이 우수한 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제공하기 위한 것이다.

Therefore, the present invention is to provide the vein medication stem cell composition with an excellent safety which prevents the fracturing and coherence of the stem cell before being injected within the blood vessel and it is suitable for inside of body the administration and it has the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration and steadily shows the therapeutic effect since it reduces inside of the blood flow the speed or the injected stem cell does not form the blood clot within the blood vessel.

본 발명은 일 관점에서, 10 내지 20 μm 의 직경을 가지고, 단세포로 존재하는 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유하는 것을 특징으로 하는 정맥 투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.

The present invention is to provide the vein medication stem cell composition which has the diameter of 10 through 20 μm in consistency and it has the stem cell existing as the single cell as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml done.

본 발명에서 사용되는 줄기세포는 바람직하게는 성체 줄기세포, 그 중에서도 지방조직, 또는 모낭#183#양막 등 상피조직에서 얻어지는 성체 줄기세포를 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는 지방 조직 유래 성체 줄기세포를 사용할 수 있다. 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)를 사용할 수 있고, 특히 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다.

In the present invention, the used stem cell may be formed of preferably, the adult stem cell, and the adult stem cell among them obtained in the epithelial tissue including the adipose tissue or the hair follicle · amnion etc. More preferably, the fat origin of organization adult stem cell can be used. The mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cells, MSCs) can be used. It may be especially, the adipose tissue originated mesenchyme stem cell (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs).

상기 지방 또는 상피조직은 포유류 유래인 것이 바람직하고, 그 중에서도 인간 유래인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)를 사용하였다.

본 발명에서, 정맥 투여용 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포는, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하여 수득한다.

본 발명의 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포 수득을 위한 배양 배지에서 사용되는 기본 배지(basal medium)는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 간단한 조성물 가지는 통상적인 배지를 뜻한다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당업계에서 이용되는 배지이면 족하다. 바람직하게는, M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DME배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장 배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.

상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 기본 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, FCS (fetal calf serum), horse serum, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민, L-글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나,

The fat or the epithelial tissue may be more, the be desirable it is among them the human origin what is the mammal origin is the be desirable. In a preferred embodiment of the present invention, the human adipose tissue originated mesenchyme stem cell (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs) was used.

In the present invention, the trunk cell is cultivated in the culture medium containing the component selected from group comprised of the stem cell, contained in the vein medication stem cell composition is the basal medium: and NAC (N-acetyl-L-cysteine), the ascorbic acid, and insulin or the insulin pseudo element, hydrocortisone, dexamethasone, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol), the EGF (epidermal growth factor) and antioxidant more than 2 kinds and it obtains.

In the basal medium used in the culture medium for the contained stem cell acquisition in the stem cell composition of the present invention is the relevant industry, the conventional culture medium having the known because of being suitable for the stem cell cultivation simple composition is meant. Generally, it is sufficient if it is the culture medium used in the relevant industry it has the MEM (Minimal Essential Medium), the DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), the RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), the K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium) to the basal medium used in cultivation. Preferably, it can be selected in group comprised of the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO), the MEM-alpha culture medium (GIBCO), and the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Welgene), the MCDB 131 culture medium (Welgene), the IMEM culture medium (GIBCO), the K-SFM, the DMEM / F12 culture medium, the PCM culture medium and MSC expansion culture medium (Chemicon) than. Particularly, among these, preferably, the K-SFM culture medium can be used.

While promoting the proliferation of the divided expression type in which the basal medium used in the acquisition of the mesenchyme stem cell culture material is known in the relevant industry of the mesenchyme stem cell it can be supplemented as the additive which the differentiation controls. Moreover, the culture medium can contain the neutral buffer agent (for example, the phosphate and/or the high concentration bicarbonate) among the iso-osmotic solution and protein nutrient (for example, the blood serum, for example, the FBS, the FCS (fetal calf serum), horse serum, serum replacement, albumin or the essential amino acid and non essential amino acid, for example, glutamine, and the L-glutamine). Furthermore, etc component (member of a part y called for example, insulin or the transferrin, the nucleoside or the nucleotide, the pyruvate, and the arbitrary ionic shape or salt, for example, the glucose, selenium, glucocorticoid, for example, the hydrocortisone and/or the reducing agent, for example, β -mercaptoethanol) discovered in the most of conservative solution culture media of this kind and lipid (the fatty acid, cholesterol, and HDL or the LDL extract of the blood serum) can be contained.

Moreover, the culture medium can be profitable to

너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제 (anti-clumping agent), 예컨대 Invitrogen이 판매하는 것들(Cat # 0010057AE)을 포함하는 것이 유익할 수 있다.

include the purpose, the cell being thick and loud or being thick and loud in the container wall or of preventing to so form the large bunch. The anti-caking agent (anti-clumping agent), and the Invitrogen sells for example the field (Cat # 0010057AE).

그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:

Among them, it can be advantageous to use the additional additive more than below 1 :

· 줄기세포 인자(SCF), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제

The other activator of the other ligand dimerizing stem cell factor (SCF), and the c-kit or the signal transmission path such as antibody.

· 다른 티로신 키나아제 관련 수용체, 예컨대 혈소판-유도된 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF), 대식세포 콜로니-자극 인자, Flt-3 리간드 및 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를 위한 리간드

The growth factor (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF), induced with the other tyrosine kinase related receptor, for example, platelet - the macrophage colony stimulating factor, and the ligand for the receptor of the Flt-3 ligand and blood vessel epidermal growth factor (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF).

· 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린

The factor that increases circular AMP concentration, for example, the forskolin.

· gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

The factor, inducing gp130 for example, LIF or the Oncostatin-M.

· 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

· hematopoiesis young rice plant growth factor, for example, the thrombopoietin (TPO)

· 변형성 성장 인자, 예컨대 TGFβ1

· deformability growth factor, for example, the TGF β 1.

· 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

· neurotrophin, for example, CNTF.

· 항생제, 예컨대 겐타마이신 (gentamicin), 페니실린, 스트렙토마이신

· antibiotic, for example, the Gentamicin, penicillin, and the streptomycin

본 발명의 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포 수득을 위한 배양 배지는 상기 기본 배지 이외에, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 추가로 함유할 수 있다.

The component selected in the stem cell composition of the present invention in group comprised of the culture medium for the contained stem cell acquisition is the NAC (N-acetyl-L-cysteine) besides the basal medium, *** acid (ascorbic acid), and insulin or the insulin pseudo element, hydrocortisone, dexamethasone, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol), the EGF (epidermal growth factor) and antioxidant more than 2 kind s can be additionally contained.

구체적으로, 인슐린을 대체하는 성분으로 인슐린 유사인자를 함유할 수 있는데, 이는 포도당 대사와 단백질 대사를 향상시켜 세포성장을 촉진하는 역할을 한다. 특히 재조합 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 사용하는 것이 바람직하다. 인슐린 유사인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 성분이 10ng/ml 미만일 경우에는 세포자살(Apoptosis)을 초래하며, 50 ng/ml을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다. 히드로코르티손의 경우, 그 함량은 60 내지 80 ng/ml일 수 있다.

Specifically, the insulin pseudo element can be contained to the component replacing insulin. This improves the glucos metabolism and protein metabolism and the cell growth serves to be promoted. Particularly, it is desirable to use the recombing IGF- 1 (Insulin-like growth factor-1). The content done with the desirable of the insulin pseudo element is 10 through 50 ng / ml. And the apoptosis is caused in case its component is 10ng / ml under. And it has the problem of the cost increment and cytotoxin in case of exceeding 50 ng / ml. The content in the case of the hydrocortisone may be 60 through 80 ng / ml.

섬유아세포 증식인자 (bFGF)를 함유할 수 있는데, 이는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 섬유아세포 증식인자의 바람직한 함량은 1 내지 100 ng/ml이다.

항산화제로는 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexanoic acid) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 셀레늄을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 항산화제로서 셀레늄을 사용하였으며, 사용되는 셀레늄의 양은 0.5 내지 10 ng/ml 인 것이 바람직하다. 이때, 이의 함량이 0.5 ng/ml 미만이면 산소독성에 민감하며, 10 ng/ml을 초과하면 심각한 세포독성을 초래하기 때문이다. 아스코르브산의 경우, 그 함량은 0.1 내지 0.3 mM으로 사용할 수 있다.

본 발명에서 사용되는 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유할 수 있다. 칼슘의 함량은 0.05 내지 0.13 mM의 양으로 함유될 수 있다. 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor; EGF)는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 함량이 10 ng/ml 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50ng/ml을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

본 발명에 따른 상기 배지에서 배양된 줄기세포는 바람직하게는 10 내지 20 μm , 더욱 바람직하게는 10 내지 15 μm 의 직경을 가지므로 혈관 내 투여에 적합하다.

또한, 본 발명에 따른 배지에서 줄기세포를 배양하는 경우, 바람직하게는 4회 내지 6회 계대 배양시 $7 \times 10^5 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 증식된 줄기세포를 얻을 수 있다. 또한, 상기 계대 배양을 통해 줄기세포의 수를 증가시키는 동안 기능적/형태학적으로 세포의 변형도 일어나지 않으므로 본 발명에 따른 줄기세포는 임상에 효과적으로 적용할 수 있다. 종래의 방법에 의한 줄기세포 배양에 의하면, 높은 수율의 줄기세포를 얻기 위해서는 계대 배양을 여러 차례 수행하여야 하므로 인력 및 시간이 많이 소요되며, 특히 계대 배양에 필요한 배지 성분 중 일부는 대단히 고가여서 경제적으로도 장점이 존재하지 않았다. 그러나, 본 발명에 따른 배지를 사용하는 경우, 단 3회 내지 5회의 계대배양만으로도 임상적으로 적용 가능할 정도의 고농도의 줄기세포를 제조하는 것이 가능하다.

따라서 본 발명은 다른 관점에서, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 아스코르브산 (ascorbic acid), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 히드로코르티손, 덱사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan s

This the fibroblast growth factor (bFGF) can be contained may be formed of the be desirable turning point is the recombinant protein the various types of cell proliferation can be caused in vivo state. The content done with the desirable of the fibroblast growth factor may be 1 through 100 ng / ml.

The selenium, ascorbic acid, vitamin E, catechin, lycopene, beta-carotene, coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid), the DHA (docosahexanoic acid) etc can be used as the antioxidant. And preferably selenium can be used. Selenium as the antioxidant in a preferred embodiment of the present invention may be referred to the be desirable used amount of the selenium is 0.5 through 10 ng / ml it used. At this time, 0.5 ng / ml U.S. its content is sensitive to the oxygen toxicity. And if 10 ng / ml is exceeded the serious cytotoxin is due to be caused. In case of the ascorbic acid, the content can use as 0.1 through 0.3 mM.

In the present invention, the component selected from group comprised of the used culture medium is the FBS (fetal bovin serum), and calcium and EGF can be additionally contained. The content of calcium can be contained in an amount of 0.05 through 0.13 mM. The epidermal growth factor (Epidermal growth factor: EGF) may be formed of the be desirable turning point is the recombinant protein the various types of cell proliferation can be caused in vivo state. The content done with the desirable of the epidermal growth factor has the toxicity in the cell 50ng / ml is exceeded it is 10 through 50 ng / ml and there is no effect that 10 ng / ml U.S. its content is particular.

More preferably, since having the diameter of 10 through 15 μm preferably the stem cell cultivated in the culture medium according to the present invention is suitable for inside of the blood vessel the administration with 10 through 20 μm .

Moreover, the case of cultivating the trunk cell in the culture medium according to the present invention, and the stem cell which preferably is proliferated in 4 times to 6 time subculture to $7 \times 10^5 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml may be obtained. Moreover, while increasing the number of stem cell through the subcultures it functions since the deformation of the cell does not occur due to the morphological the stem cell according to the present invention can apply to the clinic. Very part was the high price among the medium component necessary for the subculture the stem cell of the high yield is obtained and the advantage was economically nonexistent. But the stem cell is possible to manufacture the stem cell of the high concentration of the clinically applicable extent with the case, of using the culture medium according to the present invention shift, the subculture of 3 times to 5 time.

Therefore, the invention provides the basal medium: and NAC (N-acetyl-L-cysteine) in the other point of view, *** acid (ascorbic acid), and insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, the dexamethason

ulfate), 2-머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), EGF (epidermal growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 정맥 투여에 적합한 줄기세포 제조용 배지를 제공한다.

한편, 본 발명에 따른 줄기세포 조성물에 함유되는 줄기세포를 제조함에 있어서, 상기 기술한 본 발명에 따른 배지에서 정맥 투여용 줄기세포에 트립신을 처리할 수 있다. 배양된 줄기세포에 트립신을 처리하면 단세포 형태의 줄기세포를 얻을 수 있는데, 이때 트립신은 세포 간의 응집을 억제하여 세포가 단세포 (single cell)의 형태를 갖도록 처리되는 것으로, 세포 간의 응집 형성을 억제할 수 있는 물질이면 대체하여 사용할 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 정맥 투여용 조성물에 함유되는 줄기세포를 제조함에 있어서, 상기 기술한 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시킬 수 있다.

본 발명에서 "아스피린 함유 용액"은 아스피린 화합물을 함유하는 용액을 의미하는 것으로, 용매로는 바람직하게는 생리식염수를 사용할 수 있으나 그 외에도 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline) 등 당업계에서 일반적으로 사용하는 기제라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제 뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아세틸살리실산 (Sigma; A5376), 알타질주 (Arthalgyl Injection) 또는 아스피린리신 (신풍제약)을 생리식염수에 첨가하여 아스피린 함유 용액을 제조하였다. 이때, 첨가되는 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것이 바람직하다. 첨가되는 아스피린의 양이 그보다 많으면 세포의 생존율이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 파괴나 응집 억제의 효과가 미비할 수 있다.

줄기세포를 상기 아스피린 함유 용액에 부유시키면 이송이나 보관 중 줄기세포의 파쇄 및 응집 (aggregation)이 나타나지 않으므로 이러한 줄기세포는 신체 내 투여에 바로 적용할 수 있으므로 유용하다. 따라서, 바람직하게는 혈관 투여시 사용되는 줄기세포는 아스피린 함유 생리식염수에 부유시킨 후 이용할 수 있다.

배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에서 부유시키면 이송이나 보관 중 줄기세포가 파쇄되거나 응집되는 것을 방지할 수 있으므로 유용하다. 따라서, 혈관 내 투여시 사용되는 줄기세포는 아스피린 함유 생리식염수에 부유시킨 후 이용할 수 있다. 아스피린 함유 용액은 아스피린 화합물을 함유하는 용액을 의미하는 것으로, 용매는 바람직하게는 생리식염수를 사용할 수 있으나 그 외에도 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline) 등 당업계에서 일반적으로 사용하는 기제라면 제한없

e, the bFGF (basic fibroblast growth factor), the heparan sulfate, 2-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol), the EGF (epidermal growth factor), and the culture medium for manufacturing the stem cell which is suitable for the intravenous administration containing the component selected from the group comprised of the antioxidant more than 2 kinds.

In the meantime, the stem cell contained in the stem cell composition according to the present invention is manufactured. Trypsin can be processed in the culture medium according to the invention as described above in the vein medication stem cell. If trypsin is processed in the cultivated stem cell the stem cell of the single cell form can be obtained. At this time, trypsin controls coherence between the cell and in order to have the form of the single cell the cell is processed. If it is the material suppressing the sludging between the cell it can use substitutively.

Moreover, the stem cell contained in the vein medication composition according to the present invention is manufactured. The stem cell cultivated in the culture medium according to the invention as described above can be floated in the aspirin contain solution.

In the present invention, the solution in which "aspirin contain solution" contains the aspirin compound is meant. If it is the base which preferably can use the saline solution as the solvent but which generally it besides uses in the relevant industry including the Hartmann -D solution, the PBS (Phosphate Buffered Saline) etc. it can use without the limit. The aspirin may be formed of not only the aspirin agent but also the aspirin analogue compound sold usually. In a preferred embodiment of the present invention, the acetylsalicylic acid (Sigma: A5376), and the Alta speeding (Arthalgyl Injection) or the aspirin lysine (the manner restriction) were added in the saline solution and the aspirin contain solution was manufactured. At this time, the content of the added aspirin may be 0.0001 through 0.01 mg/ml the be desirable. The survival rate of the cell can reduce if there are many amount of the added aspirin than that. And the effect of the cell disruption or the Inhibiting the setting can be insufficient if it is less than those of that.

If the stem cell is floated in the aspirin contain solution since such stem cell immediately can apply to inside of body the administration since the fracturing and coherence (aggregation) of the stem cell does not show up among the transfer or storage it is useful. Therefore, preferably, after the stem cell used during the vein dosage floats in the aspirin containing saline solution it can use.

Since preventing from the stem cell being crushed among the transfer or storage or being cohered if the cultivated stem cell is floated in the aspirin contain solution it is useful. Therefore, after the stem cell used during inside of the blood vessel the administration floats in the aspirin containing saline solution it can use. The solution in which the aspirin contain solution contains the aspirin compound is meant. If it is the base in which

이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제 뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수 있다. 상기 첨가되는 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml 인 것이 바람직하다. 첨가되는 아스피린의 양이 그보다 많으면 세포의 생존율이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 응집 억제제의 효과가 미비할 수 있다.

상기 기술한 방법에 따라 수득한 줄기세포를 함유하는 본 발명의 정맥 투여용 줄기세포 조성물은 환자의 정맥 내로 직접 투여될 수 있다.

투여량은 예를 들면, 치료하고자 하는 목적 부위 주변의 정맥 혈관에 1개소 또는 복수 개소(예를 들면 2~50개소)에 투여할 수 있으며, 투여량은 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ 세포/kg(체중), 보다 바람직하게는 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 세포/kg(체중)이 바람직하다. 다만, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 증상, 투여조성물의 형태, 투여방법 등에 따라 상이해도 되고, 당업자라면 적절히 조정하는 것이 가능하다. 투여횟수는 1회 또는 임상상 용인 가능한 부작용의 범위에서 복수회 가능하고, 투여부위에 대해서도 1개소 또는 복수개소 투여해도 된다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 허혈기관(심장 등)의 용적비(예를 들면 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 본 발명의 치료의 대상 동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 랫트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.

본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물은, 줄기세포를 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 세포수/ml로 함유할 수 있다.

본 발명에 따른 정맥 투여용 줄기세포 조성물은, 약학적으로 허용할 수 있는 담체 및/또는 첨가물 등을 포함하는 조성물일 수 있다. 예를 들면, 열균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함해도 된다. 국소 투여를 위해, 바이오 폴리머 등의 유기물, 히드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 폴리머 또는 코폴리머, 폴리에틸렌글리콜 폴리머 또는 코폴리머 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 바람직하다.

preferably the solvent can use the saline solution but which generally it besides uses in the relevant industry including the Hartmann -D solution, the PBS (Phosphate Buffered Saline) etc. it can use without the limit. The aspirin may be formed of not only the aspirin agent but also the aspirin analogue compound sold usually. The content of the added aspirin as described above may be 0.0001 through 0.01 mg/ml the be desirable. The survival rate of the cell can reduce if there are many amount of the added aspirin than that. And the effect of the cell agglutination suppression can be insufficient if it is less than those of that.

The vein medication stem cell composition of the present invention containing the stem cell obtained according to the method as described above can be directly injected within the vein of the patient.

The amount of administration may be the amount of administration is $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^8$ cell / kg (weight), more preferably, $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ cell / kg (weight) is the be desirable it can administer to the vein of the purpose region periphery to cure to 1 place or the plural number portion (for example, 2~50 place) for example. But the amount of administration is different according to the form of the weight, the age, sex, the symptom, the dosage composition of the patient, the method of administration etc. The form are possible to appropriately control if it is the person skilled in the art. In the range of the side effect in which 1 time or the clinical picture the administration frequency is tolerable, it is multiple times possible. It administers about the administration site with 1 place or the plural number portion. It is done by the amount of administration such as human per the kg about animal except human or the amount changing the amount of administration described in the above into for example, the volume ratio (for example, the average value) of the ischemia boiler (the heart etc) with the animal of the purpose and human etc. can be administered. Human and the other purpose it is the object animal of the treatment of the present invention may include the mammal doing. And specifically the human, the monkey, the mouse, the rat, the rabbit, the amount, the minor, dog, word, pig etc is included.

The vein medication stem cell composition according to the present invention, is the stem cell is contained as $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ cell number / ml.

The carrier and/or the additive etc. the vein medication stem cell composition according to the present invention pharmaceutically can allow may be referred to the composition including. For example, it becomes including the sterilized water, the saline solution, buffer agent (the phosphoric acid, the citric acid, and the other organic acid etc), the stabilizer, salt, the antioxidant (the ascorbic acid etc), the surfactant, the suspension agent, the isotonic agent or the preservative of tolerance etc. Specifically the organic compound, the hydroxy apatite, including, the inorganic material including the biopolymer etc. is the be desirable for the topical administration to combine with the collagen matrix, the

트란, 에틸렌옥사이드#183#프로필렌옥사이드 공중합체, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 폴리에틸렌글리콜 등을 들 수 있다. 항황환연제로는, 예를 들어 N-아세틸시스테인, N-아세틸호모시스테인, 티옥토산, 티오디글리콜, 티오에탄올아민, 티오글리세롤, 티오소르비톨, 티오글리콜산 및 그 염, 티오황산나트륨, 글루타티온, 탄소원자수 1~7의 티오알칸산 등의 술폰히드릴기를 갖는 것 등을 들 수 있다. 산화방지제로는, 예를 들어 에리소르브산, 디부틸히드록시톨루엔, 부틸히드록시아니솔, α -토코페롤, 아세트산토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산팔미테이트, L-아스코르브산스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈락산트리아밀, 갈락산프로필 또는 에틸렌디아민4아세트산나트륨 (EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 들 수 있다. 동결보존제로는, 예를 들어 DMSO, 글리세롤 등을 들 수 있다. 나아가서는, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 인산나트륨, 인산칼륨, 탄산수소나트륨 등의 무기염; 시트르산나트륨, 시트르산칼륨, 아세트산나트륨 등의 유기염 등의 통상 첨가되는 성분을 함유하고 있어도 된다.

nzoateethyl, sorbic acid, phenol, cresol, the chlorocresol etc can be given about the preserver. For example, the human serum albumin, lecithin, dextran, ethylene oxide · propylene oxide copolymer, hydroxypropyl cellulose, methyl cellulose, polyoxyethylene hardened castor oil, the polyethylene glycol etc can be given about the anti-absorption agent. It does *** hydryl group can give about the sulfur reducing agent to have for example, *** hydryl group including the N-acetylcysteine, N-acetyl homocysteine, flav fertile soil acid, thiodiglycolic, thio ethanolamine, thioglycerol, thiosorbitol, thioglycolic acid and salt, the sodium thiosulfate, the glutathione, the thioalkanoic acid of the carbon atom number 1~7 etc. For example, the chelating agent including the erythorbic acid, dibutyl hydroxytoluene, butyl-hydroxyanisol, α - tocopherol, acetic acid tocopherol, L- ascorbic acid and salt, the L-ascorbic acid palmitate, L-ascorbic acid stearate, sodium bisulfite, sodium sulfite, gallic acid triamyl, gallic acid propyl or the ethylenediaminetetraacetic acid sodium (EDTA), the sodium pyrophosphate, the sodium metaphosphate etc. can be given about the antioxidant. For example, DMSO, glycerol etc. can be given about the cryopreservative. Further more, the organic salt dye, including, the component which generally is added including the inorganic salt: citric acid natrium of the sodium chloride, KCL, calcium chloride, sodium phosphate, potassium phosphate, the sodium hydrogen carbonate etc, the potassium citrate, the sodium acetate etc. is contained.

본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 배지에서 지방 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 우선, 지방흡입술(Liposuction) 등에 의해 복부로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐 분해 효소를 첨가한 DMEM배지를 사용하여 분해 후, PBS로 세척하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 100 μ m 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, EGF, 인슐린 및 히드로코티손을 함유한 K-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 그러나 이 외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

In a preferred embodiment of the present invention, the fat originated mesenchyme stem cell was cultivated in the culture medium according to the present invention. The fat originated mesenchyme stem cell can obtain to the method as follows. Firstly, it is indignant and it washes using the DMEM medium with the collagenase the organization is small pieces cut the human adipose tissue obtained with the liposuction etc. from the abdomen is separated and it washes to PBS to after, and PBS and it centrifuges for 5 minutes in 1000 rpm. The pellet which the supernatant removes and which is left in the bottom surface centrifuges for 5 minutes at 1000 rpm to PBS after doing washing. After the suspended material was removed using 100 μ m mesh it again washed to PBS. The mesenchyme stem cell while replacing the K-SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, EGF, insulin it cultivates in the DMEM (10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM ascorbic acid) culture medium and the hydrocortisone at 2 it cultivates and the mesenchyme stem cell is separated and it subcultures may be obtained. But besides, the method which is known to have in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained.

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

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

실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

embodiment 1: human adipose tissue originated

지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 지방조직을 각각 분리하여 PBS로 세척하였다. 세척된 지방조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 타입 1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37℃에서 2시간 동안 조직을 분해시켰다. 콜라게나아제 처리된 조직을 PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, 펠렛을 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100µm mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

The adipose tissue was separated from the epididymal fat pad with the liposuction and it washed to PBS. The organization the using the DMEM media with the collagenase type 1 (1mg/ml) the washed adipose tissue is small pieces cut off was dissolved in 37℃ for 2 hours. The organization handled with collagenase for 5 minutes was centrifuged at PBS after washing in 1000rpm. The supernatant was removed. The pellet for 5 minutes was centrifuged at 1000rpm to PBS after doing washing. It cultivated in 10% FBS, 2mM NAC (N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM ascorbic acid it filters in 100µm mesh-added DMEM medium.

하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5µg/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 히드로코르티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 K-SFM을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대 배양하여 지방유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

Cells which were not adhered after passing one night washed to PBS. While replacing the K-SFM at 2 containing 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng / ml rEGF, 5µg / ml insulin, 10 ng bFGF, 74ng / ml hydrocortisone and selenium of 1ng / ml it subcultured. And it subcultured with 3 and the fat originated mesenchyme stem cell was separated.

실시예 2: 정맥투여용 줄기세포 배양을 위해 적절한 배지 성분의 탐색

embodiment 2: the search of the medium component which is appropriate for the vein medication stem cell cultivation .

실시예 1에서 사용된 K-SFM 배지에 첨가되는 활성성분인 FBS, bFGF (basic fibroblast growth factor), 인슐린, 히드로코르티손, EGF (epidermal growth factor), 아스코르브산 (ascorbic acid), NAC(N-acetyl-L-cysteine) 및 셀레늄을 모두 함유하는 배지 (배지 1)와 상기 활성성분 중 하나 이상을 제거한 배지 (배지 2 ~ 배지 10)를 하기와 같이 제조하였다. 구체적인 배지 성분은 다음과 같다:

The culture medium (culture medium 1) which altogether contained the FBS called the added active ingredient, the bFGF (basic fibroblast growth factor), insulin, hydrocortisone, the EGF (epidermal growth factor), *** acid (ascorbic acid), NAC (N-acetyl-L-cysteine) and selenium in the K-SFM culture medium used in embodiment 1 and the culture medium (culture medium 2 ~ culture medium 10) removing one or greater among the active ingredient were done it manufactured. The detailed medium component is as follows :

배지 1: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄

Culture medium 1: k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + insulin + hydrocortisone + bFGF + EGF + selenium.

배지 2: K-SFM 배지 + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 FBS 제외)

Culture medium 2:k-SFM culture medium + NAC + *** acid + insulin + hydrocortisone + bFGF + EGF + selenium(the FBS exclusion among the component of the culture medium 1)

배지 3: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 bFGF 제외)

Culture medium 3:k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + insulin + hydrocortisone + EGF + selenium(the bFGF exclusion among the component of the culture medium 1)

배지 4: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아스코르브산 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 인슐린 제외)

Culture medium 4:k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + hydrocortisone + bFGF + EGF + selenium(the insulin exclusion among the component of the culture medium 1)

배지 5: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아스코르브산 + 인슐린 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 히드로코르티손 제외)

Culture medium 5:k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + insulin + bFGF + EGF + selenium (the hydrocortisone exclusion among the component of the culture medium 1)

배지 6: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 EGF 제외)	Culture medium 6:k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + insulin + hydrocortisone + bFGF + selenium(the EGF exclusion among the component of the culture medium 1)
배지 7: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 아소코르브산 제외)	Culture medium 7:k-SFM culture medium + FBS + NAC + insulin + hydrocortisone + bFGF + EGF + selenium(*** acid exclusion among the component of the culture medium 1)
배지 8: K-SFM 배지 + FBS + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 NAC 제외)	Culture medium 8:k-SFM culture medium + FBS + *** acid + insulin + hydrocortisone + bFGF + EGF + selenium(the NAC exclusion among the component of the culture medium 1)
배지 9: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + bFGF + EGF (배지 1의 성분 중 셀레늄 제외)	Culture medium 9:k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + insulin + hydrocortisone + bFGF + EGF(the selenium exclusion among the component of the culture medium 1)
배지 10: K-SFM 배지 + FBS + NAC + 아소코르브산 + 인슐린 + 히드로코르티손 + 셀레늄 (배지 1의 성분 중 bFGF 및 EGF 제외)	Culture medium 10: k-SFM culture medium + FBS + NAC + *** acid + insulin + hydrocortisone + selenium (the bFGF among the component of the culture medium 1 and EGF exclusion)

상기 활성성분이 각각 제거된 배지(배지 2 내지 배지 10) 및 K-SFM 배지 (대조군)에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 각각의 배지에서 3 passage까지 세포를 계대한 후 트립신을 처리한 뒤 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 세포 직경을 측정하였다.

In the active ingredient is the respective removed culture medium (the culture medium 2 through the culture medium 10) and K-SFM culture medium (control group), the adipose derived stem cell was cultivated. In each culture medium, the cell diameter was measured to be the confocal microscope after processing trypsin the cell to 3 passage after the group coldest day of the year.

측정 결과, 실시예 1에서 사용된 배지에서 배양된 줄기세포는 약 10 내지 15 μm 의 입도를 가진다는 것을 확인하였다 (도시하지 않음).

It confirmed that the stem cell cultivated in culture medium used in the measurement result, and the embodiment 1 had the granularity of about 10 through 15 μm (not illustrated).

실시예 3: 줄기세포의 증식능에 영향을 미치는 배지성분의 탐색

embodiment 3: the search of the medium component affecting in reproductive integrity of the stem cell .

실시예 2에서 제조한 배지 1 내지 배지 10에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 지방 줄기세포는 20대, 30대, 70대, 80대의 각 연령대별 남자 3명으로부터 수득한 지방 유래 줄기세포를 이용하였다. 실시예 1의 방법으로 수득한 지방유래 줄기세포를 상기 각각의 배지에서 1×10^5 cells/ml을 seeding하여 배양일별 (day 1, day 2, day 3, day 4)로 트립신을 처리한 뒤 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 세포 수를 확인하였다. 하기 표 1에서는 각 연령별로 남자 3명 (N=3)의 세포 수의 평균을 나타내었다. 그 결과, 하기 표에서 알 수 있는 바와 같이 본 발명에 따른 배양방법에 의하면 줄기세포를 4계대 배양하는 경우, 약 $7 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ 세포수/ml의 줄기세포를 제조할 수 있음을 확인할 수 있었다 (표 1 참조). 또한, 연령별로 다소 차이가 있지만 배지 9번의 경우 CPDL(Cell population doubling level) 값이 가장 높았으며, 20

In the culture medium 1 through the culture medium 10 manufactured in the embodiment 2, the adipose derived stem cell was cultivated. The adipose stem cell may be formed of the adipose derived stem cell obtained from each with each years of AGE man 3 people of 20 part, 30 part, 70 part, 80 part. After being seeding and processing trypsin 1×10^5 cells / ml the adipose derived stem cell obtained by the method of the embodiment 1 in each culture medium as culture date (day 1, day 2, day 3, day 4) the cell number was confirmed as the confocal microscope. In the table 1 below, the average of the cell number of the man 3 the people (N=3) was shown in terms of each age bracket. Consequently, as could know at the diagram below the stem cell could be confirmed according to the culture meth

대 및 30대의 경우에는 1×10^5 cells/ml의 줄기세포를 seeding 하였을 때 4일(d4) 되는 시점에서 세포 수가 10~11배 증가하였으며, 70대 및 80대의 경우에는 세포 수가 7~9배 증가하였음을 확인할 수 있었다 (도시하지 않음).

od according to the present invention in case 4 sub cultures to could manufacture the stem cell of about $7 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ cell number / ml (refer to table 1). Moreover, it had the some extent difference to the age bracket but the CPDL (Cell population doubling level) value was the highest in case of the culture medium 9 burn. And when doing the stem cell of 1×10^5 cells / ml in 20 part and 30 part with seeding it was increased up to the cell number in the point of time when becoming with 4 (d4) with 10~11 ship. And it could confirm that it was increased up to the cell number in 70 part and 80 part with 7~9 ship (the not illustrated).

실시에 4: 줄기세포의 단일 세포 (singlecell) 유지 능력

embodiment 4: the single cells (single cell) maintainability of the stem cell.

(1) 아세틸살리실산을 농도별로 첨가한 생리식염수로 처리

(1) The saline solution adding the acetylsalicylic acid according to the concentration the processing.

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 아세틸살리실산 (Acetylsalicylic acid) (Sigma; A5376)을 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12시간, 24시간에서의 생존율을 관찰하였다. 상기 아세틸살리실산을 첨가한 생리식염수는, 생리식염수에 아세틸살리실산을 농도별로 첨가하여 37℃에서 30분 동안 sonication하여 제조하였다.

After it trypsinized in the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 after it floated in the saline solution adding the acetylsalicylic acid (Acetylsalicylic acid) (Sigma: A5376) according to the concentration to 1.0×10^7 cells concentration 12 hours, and the survival rate at 24 hours were observed. The saline solution with acetylsalicylic acid added the acetylsalicylic acid in the saline solution according to the concentration and it was the sonication and the concentration manufactured from 37℃ for 30 minutes.

실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 아스피린의 첨가량이 1.0mg 이상인 경우에는 세포 독성이 있음을 확인할 수 있었다.

In case the additive content of the aspirin was 1.0mg or greater it could confirm the experimental result, and the saline solution 10 ml that the experimental result had the cytotoxin.

(2) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수로 처리

(2) The saline solution adding the Alta speeding (Arthalgyl Injection) according to the concentration in the processing.

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12시간, 24시간에서의 생존율을 관찰하였다.

After it trypsinized in the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 after it floated in the saline solution adding the Alta speeding (Arthalgyl Injection) according to the concentration to 1.0×10^7 cells concentration 12 hours, and the survival rate at 24 hours were observed.

실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 아스피린의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우에는 지방줄기세포의 생존에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 지방줄기세포를 아스피린 부유액에 부유시 72시간까지 정처 가능하나, 줄기로는 24 시간 이내 처리하는 것이 좋았다.

It could confirm that it did not affect the alive of the adipose stem cell to the experimental result, and the saline solution 10 ml in case the additive content of the aspirin was 0.001 through 0.1mg. The adipose stem cell could be assumed the helm of state in the aspirin supernatant liquid in the stray to 72 hours. But it was good to treat with the ultradia

n to be good.

(3) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 증식력

(3) The colonization ability of the stem cell processed in the saline solution adding the Alta speeding (Arthalgyl Injection) according to the concentration.

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 24시간 후의 생존율을 관찰하였다.

After trypsinized in the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 after it floated in the saline solution adding the Alta speeding (Arthalgyl Injection) according to the concentration to 1.0×10^7 cells concentration the survival rate after 24 hours was observed.

실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 알타질주의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우, 지방줄기세포의 증식력에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

In case the additive content of the Alta speeding was 0.001 through 0.1mg about the experimental result, and the saline solution 10 ml it could confirm not to affect the multiplication capacity of the adipose stem cell.

또한, 상기 부유시킨 세포 1.0×10^6 cells를 7일간 배양한 뒤의 세포 수와 생존율도 관찰한 결과를 하기에 나타내었다.

Moreover, hereinafter the cell number after cultivating the cell 1.0×10^6 cells floated as described above with 7 days and the result which the survival rate observed were shown.

(4) 아스피린리신 (신풍제약)을 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 특성

(4) The property of the stem cell processed in the saline solution with aspirin lysine (the manner restriction).

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 아스피린리신 (신풍제약)을 농도별로 첨가한 생리식염수에 줄기세포를 1.0×10^6 cells 농도로 부유시킨 후, 5일간 배양하여 세포수를 측정하였다. 그리고 24시간 냉장 보관 후 FACS를 측정하여 세포 특성을 확인하였다.

After it trypsinized in the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 after the stem cell was floated in the saline solution adding the aspirin lysine (the manner restriction) according to the concentration to 1.0×10^6 cells concentration it cultivated with 5 liver and the cell number was measured. And FACS was measured after 24 hours refrigeration and the cell property was confirmed.

실험 결과, 아스피린리신 농도에 의한 세포 생존율은 다소 감소하나 유의적이지 않았으며 5일간 배양한 후의 세포수도 개체 차이는 있으나 농도별 차이는 거의 없었다. 24시간 동안 아스피린이 첨가된 생리식염수에 부유한 후 24시간 냉장 보관한 지방유래 중간엽 줄기세포의 특성도 아스피린 농도에 의한 영향은 없는 것으로 관찰되었다.

The experimental result, and the cell viability by the aspirin lysine concentration a bit reduced but it was not the significant and the individual difference had the cell number after cultivating with 5 liver but there was nearly no concentration difference. It was observed that the property of the fat originated mesenchyme stem cell which it kept in refrigeration 24 hours after being wealthy in the aspirin-added saline solution the influence by the aspirin concentration did not have for 24 hours.

이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것

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 b

들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

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.

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.)