

## Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/0775   C12N 5/02   C07K 14/475   A61K 35/12
Application No.	1020100119284
Application Date	20101129
Unexamined Publication No.	1020120057784
Unexamined Publication Date	20120607
Agent.	LEECHYOYOUNG
Inventor	Park, Hyeong-Geun   Kang, Sung-Keun   Ra, Jeong-Chan   Yim, Cha-Ok

### 발명의 명칭

줄기세포의 안정성 증진용 조성물

### Title of Invention

The composition for the stability enhancement of the stem cell.

### 요약

본 발명은 줄기세포의 안정성을 증진할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 중간엽 줄기세포 배양물 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 관한 것이다.

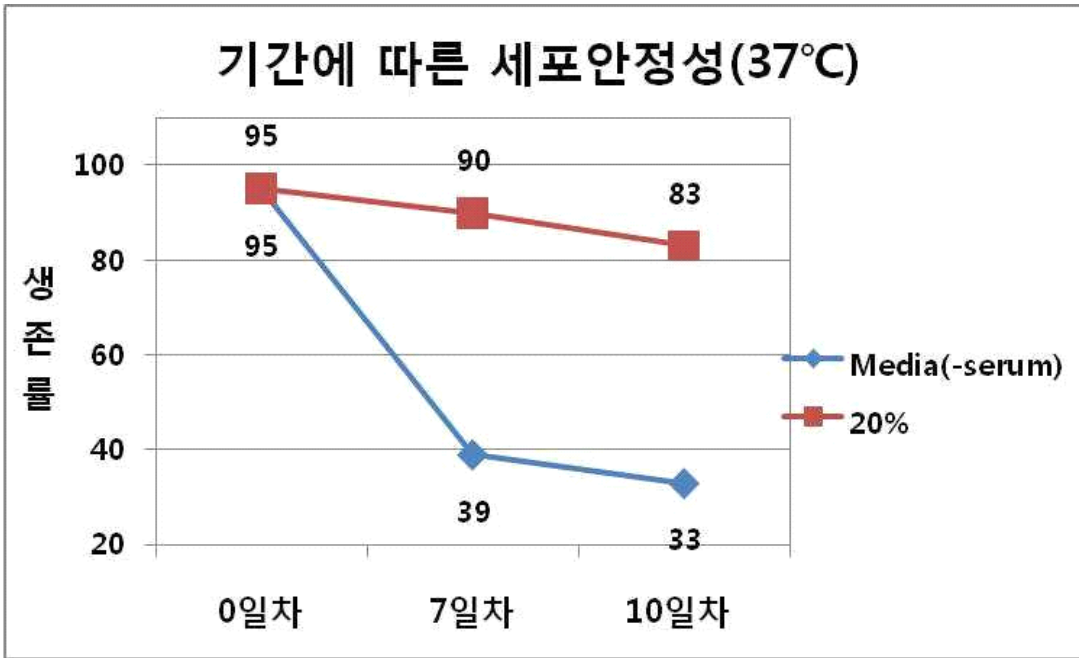
본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은, 줄기세포의 안정성을 증진하여, 생존율을 높게 유지하는 효과가 있으며, 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품은 장기간(10일) 동안, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 80% 이상으로 유지할 수 있으므로, 세포치료제 주사제품의 장기간 운송에 활용할 수 있고, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 높은 생존율에 따라, 세포치료의 효과가 뛰어나므로, 양질의 세포치료제 주사제품의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.

### Abstract

The invention relates to the composition increasing the stability of the stem cell, more specifically to the composition for the stability enhancement of the stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material and base.

The composition for the stability enhancement of the stem cell according to the present invention increases the stability of the stem cell. The stability has the effect maintaining the survival rate. And the cell therapy product injection product containing the composition for the stability enhancement of the stem cell according to the present invention can maintain the survival rate of the stem cell included in the cell therapy product for the long term (10) over 80%. Therefore the survival rate can apply to the long term carrying of the cell therapy product injection product. The stability is excellent in the effect of the cytotherapy according to the high survival rate of the stem cell included in the cell therapy product. Therefore the effect can be used for the manufacture of the high-quality cell therapy product injection product.

### 대표도면 (Representative drawing)



#### 청구의 범위

##### 청구 1항:

다음 단계를 통해 수득된 중간엽 줄기세포 배양물; 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물:

(a) 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하는 단계; 및

(b) 상기 배양액에서 배양된 줄기세포를 제거하여 중간엽 줄기세포 배양물을 수득하는 단계.

##### 청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양물은 중간엽 줄기세포를 7 내지 9일동안 배양하여 제조된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

##### 청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 배양물은 TGF (Transforming Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), KGF (Keratinocyte Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), Fibronectin, VEGF (vascular endothelial growth factor) 및 Procollagen으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 2가지 이상 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

##### 청구 4항:

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양물을 10 내지

#### Scope of Claims

##### Claim 1:

The composition for the stability enhancement of stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material obtained through the following step and base: the step of obtaining the mesenchyme stem cell culture material it removes in the K- SFM (Keratinocyte-Serum Free Medium) culture medium containing the NAC (N-Acetyl Cysteine), ascorbic acid, calcium, insulin

(a) mesenchyme stem cell and head computerized axial tomography (Hydrocortisone).

##### Claim 2:

As for claim 1, the composition for the stability enhancement of the stem cell in which the mesenchyme stem cell culture material cultivates the mesenchyme stem cell for 7 through 9 and which is manufactured.

##### Claim 3:

As for claim 1, the composition for the stability enhancement of the stem cell containing the component selected from group comprised of the culture material is the TGF (Transforming Growth Factor), the bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), the IGF (Insulin-like Growth Factor), the KGF (Keratinocyte Growth Factor), the HGF (Hepatocyte Growth Factor), fibronectin, the VEGF (vascular endothelial growth factor) and Procollagen over 2 kinds.

##### Claim 4:

As for claim 1, the composition for the stability

50%(v/v) 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

enhancement of the stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material with 10 through 50 % (v/v).

**청구 5항:**

**Claim 5:**

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포 배양물을 20%(v/v) 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

As for claim 1, the composition for the stability enhancement of the stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material with 20 % (v/v).

**청구 6항:**

**Claim 6:**

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

As for claim 1, the composition for the stability enhancement of the stem cell called the selected mesenchyme stem cell in group comprised of the mesenchyme stem cell is 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 and placenta originated mesenchyme stem cell.

**청구 7항:**

**Claim 7:**

제1항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 지방 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

As for claim 1, the composition for the stability enhancement of the stem cell called the mesenchyme stem cell is the fat originated mesenchyme stem cell.

**청구 8항:**

**Claim 8:**

제1항에 있어서, 상기 기제는 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

As for claim 1, the composition for the stability enhancement of the stem cell called selected one or greater in group comprised of base is the saline solution, and the Hartmann -D solution and PBS (Phosphate Buffered Saline).

**청구 9항:**

**Claim 9:**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 항황환원제, 산화방지제로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물.

As for any one of claim 1 through 8, the composition for the stability enhancement of the stem cell containing one or greater selected in group comprised of the composition for the stability enhancement of the stem cell is the suspension agent, solubilizing agent, stabilizer, isotonicising agent, preserver, anti-absorption agent, surface activation agent, diluent, PH adjusting agent, analgesia agent, buffer agent, the sulfur reducing agent, and the antioxidant it does than.

**청구 10항:**

**Claim 10:**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품.

The cell therapy product injection product containing the composition for the stability enhancement of the stem cell of any one claim among claim 1 to claim 8.

**청구 11항:**

**Claim 11:**

제9항의 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품.

The cell therapy product injection product containing the composition for the stability enhancement of the stem cell of claim 9.

## 기술분야

본 발명은 줄기세포의 안정성을 증진할 수 있는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 중간엽 줄기세포 배양물 및 기체를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 관한 것이다.

## Technical Field

The invention relates to the composition increasing the stability of the stem cell, more specifically to the composition for the stability enhancement of the stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material and a base.

## 배경기술

21세기 생명공학은 인간복지를 목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 특히 최근 줄기세포의 이용기술은 난치병 치료의 새로운 장으로 떠오르고 있다. 이전까지는 인간의 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역 거부와 공급장기 부족, 유전자에 대한 지식 부족으로 실용화가 미진하였다.

## Background Art

21 intensity genetic engineering presents the possibility of the new solution the human welfare as the goal to the capacity for eating, the environment, and the health problem. And recently the utilizing technology of the stem cell rises to the sky as the new field of the incurable disease treatment. The organ transfer or the gene therapy etc. were presented for the incurable disease treatment of human to the previous. But the put to practical use was unexhausted to the immunological rejection and source of supply lack of energy, and the knowledge deficit about the gene.

이에 줄기세포 연구에 대한 관심이 고조되어, 증식과 분화를 통해 모든 기관을 형성할 능력을 가진 만능 줄기세포가 대부분의 질병 치료는 물론 장기 훼손을 근본적으로 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 또한, 많은 과학자가 인체의 거의 모든 장기재생은 물론 난치병이었던 파킨슨병, 각종 암, 당뇨병과 척수손상 등의 치료에 이르기까지 다양하게 줄기세포의 적용 가능성을 제시해왔다.

Thus, it was recognized that pluripotent stem cell having the capability in which the concern about the stem cell research is increased and forming all boilers through proliferation and differentiation fundamentally could solve the long-term damage as well as the most of treatment of illnesses. Moreover, until many scientist nearly told of the human body to the treatment including the parkinson's disease, which was the intractable disease as well as all long-plaies all kinds of the cancers, the diabetes and spinal cord injury etc. it was various the applicability of the stem cell had been being presented.

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).

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 cells)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로, 수정 4-5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며 이를 배아 줄기세포라 하며 다양한 다른 조직세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다능성 줄기세포(multipotent stem cells)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포이다.

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 (pluripotent stem cells) is that the new life while being derived from the positioned inner cell mass it says to be the embryonic stem cell and it is this specialized to various other histiocytes is formed in the inside of the blastocyst showing up as the cell which can be generated by the ectoderm, the mesoderm, and the various cells and organization of the endoderm layer originated after the correction 4-5. The multipotent stem cells may be the stem cell specializing in the cell specific for the organization containing this cell and boiler.

다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang et al., *Nature*, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 소스이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma et al., *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al., *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직내의 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린 된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들을 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

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 vitro*상에서 지방세포, 골 형성세포, 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 주목 받고 있다.

지금까지 알려진 지방 유래 줄기세포로는 상피세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 성체 줄기 세포(M. Brzoska et al., *BBRC*, 330:142, 2005), 골 형성 및 지방 세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포(Y. Cao et al., *BBRC*, 332:370, 2005), 신경세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 성체 줄기세포(K.M. Safford et al., *BBRC*, 294:371, 2005), 지방세포로 분화 가능한 쥐 지방 유래 줄기세포(R. Ogawa et al., *BBRC*, 319:511, 2004), 골 형성 및 연골 형성세포로 분화 가능한 쥐 지방 유래 줄기세포(R. Ogawa et al., *BBRC*, 313:871, 2004), 연골세포로 분화 가능한 인간 지방 유래 줄기세포(H.A. Awad et al., *Biomaterials*, 25:3211, 2004), 신경세포로 분화 가능한 쥐 지방 유래 줄기세포(J. Fujimura et al., *BBRC*, 333:116, 2005) 및 골세포, 연골세포, 신경세포 또는 근육세포로 분화 가능한 지방 유래 줄기세포(미국특허 6,777,231) 등이 있다.

따라서 위와 같이 대량으로 획득이 가능해진 줄기세포는 악성, 신진대사의 선천이상, 혈액소병증 및 면역결핍을 비롯한 매우 다양한 장애의 치료에 사용될 수 있는 잠재력을 갖는 것이 널리 알려져 있는바, 현재 피부 재생 등 줄기세포 자체를 주사하는 세포치료제로서의 이용이 늘어나고 있는 추세이다. 이에 따라, 당업계에서는 줄기세포에 대한 관심이 증대되면서, 다양한 치

In the Multipotent stem cell is the adult bone marrow, it was separated. Thereafter it was confirmed in the other different adult tissue (C.M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.*, 12:502, 2002). In other words, the bone marrow is the source of the most widely known stem cell. And the Multipotent stem cell was confirmed from skin, the blood vessel, and the muscle and brain (J.G. Toma et al., *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al., *Science*, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., *Exp. Hematol.*, 30:896, 2002). But the stem cell within the adult tissue like the bone marrow very rarely exists. It is difficult to this cells be not issued with differentiation induction and cultivate. It is difficult to cultivate the cells if there are no culture mediums which the specifically are screened. That is, it has the disadvantage that it is very difficult to separate stem cells and preserve *in vitro*.

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 Physiol.*, 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 receives as the source of the new stem cell complementing the existing disadvantage with attention.

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

Therefore, the stem cell in which the acquisition becomes massively possible like the upper part is the malignancies, the congenital anomaly of metabolism, and the hemoglobinopathy and immunological deficiency, very, the various failures of potential which can be used at treatment may be referred to the trend it is widely k

료 목적, 특히 세포치료제로의 용도 및 다른 의학 관련 목적을 위해 장거리를 경유하는 다수의 인간 줄기세포의 안정적인 공급이 필수적이 되고 있는 실정이다.

그러기 위해서 7~10일 정도의 장기간에도, 높은 줄기세포 생존율을 유지하여야 하는 것이 필수적이다. 그러나 현재, 얼리지 않은 세포를 장기간 유지할 경우, 세포 생존율이 현저하게 낮아지는 문제가 있다. 즉, 10일 정도면 40%정도의 세포가 사멸하고 있어 큰 문제가 되고 있다.

따라서 장기간 생존율을 유지하기 위한 종래 기술로는, 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 냉장 보관 조건을 통해 생리식염수에 부유하여 보관하는 기술이 있었으나, 그 경우 48시간 이상 보관 시, 70%이상의 생존율을 나타내기 어려웠다. 이를 개선하기 위해 슈크로오스나 알부민을 첨가하는 경우 48시간 내지 72시간까지는 생존율이 70%이상을 나타내어, 안정성이 향상되는 것이 확인된 바 있다. 또한, 기체를 생리식염수 대신 하트만-D나 PBS로 하는 경우에도 유의적인 큰 차이는 없었으며, 슈크로오스, 알부민 등의 첨가가 줄기세포의 안정성을 연장하는 것으로 확인되었다(한국 특허출원번호 제2008-69063호).

또한, 세포를 동결시켰다가 해동시켜 사용하는 기술의 경우, 해동 당시의 생존율은 냉장상태에 비할 바 아니며, 부형제의 첨가 시 생존율이 다소 높아질지 모르나, 생물학적 관점에서 추후 장기적인 세포의 손상 및 줄기세포로서의 활동 가능성이 낮을 수 있어 기능이 문제되고, 동결 상태로의 운송도 냉장 운송보다 힘들어, 냉장조건(4℃)에서 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 장기간 안정적으로 높게 유지해 주는 안정성 증진용 조성물의 개발이 필요한 실정이었다.

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 줄기세포의 높은 생존율을 유지하기 위한 안정성 증진용 조성물의 개발에 예의 노력한 결과, 중간엽 줄기세포 배양물을 안정성 증진용 조성물로 구성하여 첨가한 경우, 줄기세포의 생존율이 7~10일 동안 안정적으로 높게 유지됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

nown to have and that the usage as the cell therapy product scanning the stem cell itself including the skin regeneration etc. is increasingly used. Accordingly, in the relevant industry, while the concern about the stem cell increases the stable supply of the multiple human stem cells passing through the long distance is essential for the various Intention-to-treats, and the medical science related purpose different from especially, the use to the cell therapy product it becomes.

In order to say so it is essential to the long term of about 7~10 to maintain the high stem cell survival rate. But there is a problem that when the present, and the cell which it does not freeze are maintained the long term the cell viability is remarkably decreased. That is, the cell of about 10 about 40% is the large problem it dies out.

Therefore, it was wealthy and it had the human adipose tissue originated mesenchyme stem cell the technology kept to the prior art for maintaining the long term existence rate through the refrigeration condition in the saline solution. But the technology was difficult over the case 48 hours in storage to show the survival rate more than 70%. The survival rate shows 70% or greater the sucrose or the albumin in case the addition to 48 hours to 72 hours in order to improve this. The stability is confirmed that the stability is improved. Moreover, the hartmann -D instead of the saline solution base or the large difference called the significant it is done by PBS did not have. And the addition including the sucrose, the albumin etc. extended the stability of the stem cell and the stability was confirmed (KR2008-69063 A).

Moreover, the cell may be referred to the actual condition in which it is not in case of the technology which stopped and which thaws and used with it and the survival rate of the defrost at the time compares to the refrigeration state the survival rate never be enhanced in the addition of the diluting agent and but the activity possibility as the damage of the long-time later on cell and stem cell can be low in the biological point of view and the function becomes a problem and the carrying to the frozen mode is hard than the chilled distribution and the development of the composition for the stability enhancement which steadily high maintains the survival rate of the stem cell included in the cell therapy product the long term in the refrigeration condition (4℃) is.

Made many efforts in the development of the composition for the stability enhancement in which to accomplish the above objects, the inventors maintained the high survival rate of the stem cell of the above. Then in case the mesenchyme stem cell culture material was organized on the composition for the stability enhancement and the development added the survival rate confirmed that the survival rate of the stem cell was steadily high maintained for 7~10. The invention was completed.

## 해결하고자 하는 과제

본 발명의 목적은 중간엽 줄기세포 배양물을 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품을 제공하는 데 있다.

## 과제 해결 수단

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM (Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일 동안 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양액에서 배양된 줄기세포를 제거하여 수득된 중간엽 줄기세포 배양물; 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품을 제공한다.

## 발명의 효과

본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은, 줄기세포의 안정성을 증진하여, 생존율을 높게 유지하는 효과가 있으며, 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 함유하는 세포치료제 주사제품은 장기간(10일) 동안, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 80% 이상으로 유지할 수 있으므로, 세포치료제 주사제품의 장기간 운송에 활용할 수 있고, 세포치료제에 포함된 줄기세포의 높은 생존율에 따라, 세포치료의 효과가 뛰어나므로, 양질의 세포치료제 주사제품의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명에서 사용하는 용어 #34#주사용 세포치료제 또는 세포치료제#34#란 조직의 결함을 치료하기 위해 줄기세포를 함유하여 비경구투여, 즉 주사의 형태로 결함부위 또는 그 인접부위에 주사되어, 결함을 교정할 수 있는 약학 조성물을 의미한다.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#기제#34#란 약학 조성물의 약리학적 특성을 나타내는 유효성분 외, 액체의 형태 등 형태를 유지하기 위하여 부가하는 물질을 의미하는 것으로, 일반적으로는 액체 형태를 위한 기제로서 생리식염수(Saline), 하트만-

## Problem to be solved

The composition for the stability enhancement of the stem cell in which this Purpose of the invention contains the mesenchyme stem cell culture material is to be provided.

It is another object of the present invention to provide the cell therapy product injection product containing the composition for the stability enhancement of the stem cell.

## Means to solve the problem

To accomplish the above objects, the invention provides the NAC (N-Acetyl Cysteine) (a) mesenchyme stem cell, the ascorbic acid, calcium, and insulin, and the composition for the stability enhancement of the stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material removing the stem cell cultivated in (b) culture fluid and is obtained and base.

The invention also provides the cell therapy product injection product containing the composition for the stability enhancement of the stem cell.

## Effects of the Invention

The composition for the stability enhancement of the stem cell according to the present invention increases the stability of the stem cell. The stability has the effect maintaining the survival rate. And the cell therapy product injection product containing the composition for the stability enhancement of the stem cell according to the present invention can maintain the survival rate of the stem cell included in the cell therapy product for the long term (10) over 80%. Therefore the survival rate can apply to the long term carrying of the cell therapy product injection product. The stability is excellent in the effect of the cytotherapy according to the high survival rate of the stem cell included in the cell therapy product. Therefore the stability can be used for the manufacture of the high-quality cell therapy product injection product.

## Description of Embodiments

In the present invention, in order to cure the deformity of the organization the deformity contains the stem cell and the term " scanning cell therapy product or the cell therapy product " used is scanned in the form of the parenteral administration, in other words, injection in the defect site or the adjacent portion. The pharmaceutical composition correcting the error is meant.

In the present invention, the term " base " used means the material which it adds in order to maintain the form including the active ingredient extrinsic, showing the pharmacology of the pharmaceutical composition the for

D 용액, PBS (Phosphate Buffered Saline) 등을 이용하고 있으나 그 외 여러 가지 조성을 포함할 수 있는 물질을 의미한다.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#줄기세포(stem cell)#34#이란 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.

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.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#지방 유래 줄기세포#34#란 지방조직에서 분리해 낸 미분화 줄기세포로, 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.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#배양액#34#은, 상기 중간엽 줄기세포를 특정 성분을 함유하는 배지에 배양시킨 후 수거한 배지를 뜻한다. 결국 배양액에는 하기 설명하는 배양물 (배지 성분 및 세포 분비물) 및 배양된 줄기세포가 포함되어 있다.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#중간엽 줄기세포 배양물 #34#이란 상기 중간엽 줄기세포를 특정 성분을 함유하는 배지에 배양시킨 후, 배지를 수거한 다음 세포 debris(debris)를 제거하고 남은 브로스(broth)를 의미한다. 결국 상기 배양물에는 배지가 함유하고 있던 주요 성분 및 중간엽 줄기세포의 분비물이 포함되어 있다고 할 수 있다.

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 용어는 당 업계에서 일반적으로 쓰이는 용어의 뜻으로 사용되었다. 또한, 본 명세서에 기재된 실험방법은 특별히 기재되어 있지 않으면, 당 업계에서 일반적으로 실시하는 방법으로 수행되었다.

m of liquid etc. Generally the material using the saline solution, the Hartmann -D solution, the PBS (Phosphate Buffered Saline) etc. as the base for the liquid form but may include besides various compositions is meant.

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.

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.

In the present invention, the term " adipose derived stem cell " used the separation method can be as follows: to the pulverization stem cell done with \*\*\* west separation. 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.

In the present invention, the term " culture fluid " used means the culture medium which it takes away after culturing the mesenchyme stem cell in the culture medium containing the specific component. In conclusion, the culture fluid includes culture material (the medium component and cell discharge) it does and the cultivated stem cell.

In the present invention, after the term " mesenchyme stem cell culture material " used cultures the mesenchyme stem cell in the culture medium containing the specific component the broth is meant to remove the cell debris after taking away the culture medium. In conclusion, the culture material includes the principal component which the culture medium contains and the secretion of the mesenchyme stem cell.

In the other equation the term described in this specification it is not defined is the relevant industry, generally it was used as the meaning of the used term. Moreover, if the experimental method described in this specification was not specially reported it was performed in the relevant industry to the method generally for performing.

이하 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

Hereinafter, specifically it describes the invention.

본 발명은 일 관점에서, (a) 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로 코티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하는 단계; 및 (b) 상기 배양액에서 배양된 줄기세포를 제거하여 수득된 중간엽 줄기세포 배양물; 및 기제를 함유하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 관한 것이다.

The invention relates to the NAC (N-Acetyl Cysteine) in the consistency, (a) mesenchyme stem cell, the ascorbic acid, calcium, and insulin, and the composition for the stability enhancement of the stem cell containing the mesenchyme stem cell culture material removing the stem cell cultivated in (b) culture fluid and is obtained and base.

본 발명의 일 실시예에 따르면, 중간엽 줄기세포를 상기 성분들을 함유한 K-SFM배지에서 배양할 경우, 각종 유용한 성분들에 대해 높은 생산력을 보이며, 특히 바람직하게는 4 내지 9일동안 배양하는 경우, 유용한 성분의 분비농도가 높음을 확인하였다. 가장 바람직하게는 7 내지 9일동안 배양하는 경우, 1 내지 2일 동안 배양하는 경우에 비하여 약 4배정도 높은 분비농도를 보였다. 9일 이상 배양하는 경우, 분비된 유용한 성분의 농도가 감소함을 확인하였으며, 또한, 배양하는 배지가 무혈청 배지이므로 장기간 배양시 영양성분의 부족으로 세포가 사멸하게 됨은 당업자에게 자명한 것이다.

According to a preferred embodiment of the present invention, when the mesenchyme stem cell was cultivated in the K-SFM culture medium containing components the high productive capacity was looked at about all kinds of the useful components. And the case particularly of preferably cultivating for 4 through 9, and the secretion concentration of the useful component confirmed the highness. More preferably, in case of cultivating for the case of cultivating for 7 through 9, and 1 through 2 it compared and about 4 assignment showed the high secretion concentration. It confirmed that the concentration of the useful component secreting was decreased in case 9 biphasic culture. And it is obvious to the person skilled in the art that the cell dies out in the long term culture to the shortage of the nutrient component since the culture medium which it moreover cultivates is the invitrogen medium.

따라서, 본 발명의 바람직한 일 양태로, 중간엽 줄기세포를 NAC(N-Acetyl Cysteine), 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손(Hydrocortisone)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte-Serum Free Medium) 배지에서 4 내지 9일동안 배양하여 중간엽 줄기세포 배양물을 얻을 수 있다. 가장 바람직하게는 7 내지 9일동안 배양하여 중간엽 줄기세포 배양물을 얻을 수 있다.

Therefore, the mesenchyme stem cell culture material it cultivates in the desirable of the present invention the K-SFM (Keratinocyte-Serum Free Medium) culture medium containing the NAC (N-Acetyl Cysteine), the ascorbic acid, calcium, insulin one aspect, done the mesenchyme stem cell and the head computerized axial tomography (Hydrocortisone) for 4 through 9 may be obtained. More preferably, the mesenchyme stem cell culture material it cultivates for 7 through 9 may be obtained.

상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 통상적인 배지, 예를 들면 DMEM, MEM, K-SFM 배지 등을 사용할 수 있는데, 바람직하게는 무혈청 배지를 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 K-SFM (Keratinocyte-SFM; Keratinocyte serum free medium) 배지를 사용할 수 있다.

In the relevant industry as the culture medium used in the acquisition of the mesenchyme stem cell culture material, the known because of being suitable for the stem cell cultivation conventional culture medium, for example, DMEM, MEM, the K-SFM culture medium etc. can be used. The invitrogen medium can be used. And more preferably, the K-SFM (Keratinocyte-SFM; Keratinocyte serum free medium) culture medium can be used.

본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 배지는 NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손과 같은 성분을 포함하고 있으며, 이로 인하여 중간엽 줄기세포는 각종 유용한 성분들에 대해 높은 생산력을 보일 수 있다. 특히 인슐린의 경우 바람직하게는 1-10 $\mu$ g/ml 농도로 포함시킬 수 있다.

The culture medium used in the acquisition of the mesenchyme stem cell culture material of the present invention comprises the component like the NAC, the ascorbic acid, calcium, insulin and head computerized axial tomography. And due to this, the mesenchyme stem cell can show the high productive capacity on all kinds of the useful components. Particularly, in case of insulin, preferably it can include to 1-10 $\mu$ g / ml concentration.

상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 배지는 당업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다.

While promoting the proliferation of the divided expression type in which the culture 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.

또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 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, 피루브산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대  $\beta$ -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

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, FBS, the serum replacement, and the albumin or the essential amino acid and non essential amino acid, for example, glutamine). Furthermore, etc component (member of a party 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,  $\beta$ -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.

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

Moreover, the culture medium can be profitable to 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 :

- 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), 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 Steel factor), 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 TGF $\beta$ 1

- deformability growth factor, for example, the TGF  $\beta$  1.

- 다른 성장 인자, 예컨대 표피 성장 인자(EGF)

- other growth factor, for example, the epidermal growth factor (EGF)

- 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

- neurotrophin, for example, CNTF.

- N-acetyl-L-cysteine (NAC)

- N-acetyl-L-cysteine (NAC)

- Hydrocortisone

- Hydrocortisone

- Ascorbic Acid

- Ascorbic Acid

본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물을 얻기 위한 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 이하와 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  $\mu$ m 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하루 밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에 이미 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물을 얻기 위한 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 이하와 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  $\mu$ m 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하루 밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에 이미 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

본 발명의 중간엽 줄기세포 배양물은, 예를 들어 다음과 같은 방법으로 수득할 수 있다. 즉, 중간엽 줄기세포를 90% confluency로 배양한 후, NAC, ascorbic acid, calcium, 인슐린 및 Hydrocortisone를 함유한 Keratinocyte-SFM 배지에서

The mesenchyme stem cell for obtaining the mesenchyme stem cell culture material of the present invention can obtain to for example, the method like this.

Firstly, it is indignant and it washes using 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 was hinged. After the suspended material was removed using 100  $\mu$ m mesh it again washed to PBS. The mesenchyme stem cell while replacing the keratinocyte -SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, the rEGF, BPE, insulin it cultivates in the DMEM (10% FBS. 2 mM NAC, 0.2 mM ascorbic acid) culture medium and the head computerized axial tomography at 2 it cultivates and the mesenchyme stem cell is separated and its subcultures may be obtained. Besides, the method which is known to have in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained. Besides, the method which is known to have the already in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained.

The mesenchyme stem cell for obtaining the mesenchyme stem cell culture material of the present invention can obtain to for example, the method like this.

Firstly, it is indignant and it washes using 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 was hinged. After the suspended material was removed using 100  $\mu$ m mesh it again washed to PBS. The mesenchyme stem cell while replacing the keratinocyte -SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, the rEGF, BPE, insulin it cultivates in the DMEM (10% FBS. 2 mM NAC, 0.2 mM ascorbic acid) culture medium and the head computerized axial tomography at 2 it cultivates and the mesenchyme stem cell is separated and its subcultures may be obtained. Besides, the method which is known to have in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained. Besides, the method which is known to have the already in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained.

The mesenchyme stem cell culture material of the present invention can obtain for example by the method as follows. That is, in the Keratinocyte-SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium,

4 내지 9일동안 배양한 후, 배지를 수거하여 세포를 제거하고 중간엽 줄기세포 배양물을 수득할 수 있다. 가장 바람직하게는 7 내지 9일동안 배양하여, 배지를 수거한 후 원심분리 및 필터링 하여 세포 debris를 제거함으로써 중간엽 줄기세포 배양물을 수득할 수 있다.

insulin after doing 90% confluency the cultivation, the mesenchyme stem cell and the Hydrocortisone, the culture medium is taken away for 4 through 9 after doing cultivation and the cell can be removed and the mesenchyme stem cell culture material can be obtained. More preferably, it cultivates for 7 through 9. By after taking away the culture medium filtering with the centrifugation and removing the cell debris the mesenchyme stem cell culture material can be obtained.

본 발명의 일 실시예에서는 상기 방법으로 수득한 중간엽 줄기세포 배양물을 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 10~50% (v/v), 바람직하게는 20% (v/v)로 포함시키는 경우, 줄기세포의 생존율이 기존에 비하여 유의하게 높아짐을 확인하였다.

In a preferred embodiment of the present invention, it confirmed that 10~50% (v/v), the case preferably of including to 20% (v/v), and the survival rate of the stem cell were carefully the mesenchyme stem cell culture material obtained by the method enhanced in the composition for the stability enhancement of the stem cell in comparison with the existing.

본 발명의 일례로, 상기 중간엽 줄기세포 배양물은 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 바람직하게는 10~50%(v/v)로 함유될 수 있다. 더욱 바람직하게는 10~30%(v/v)로 함유될 수 있으며, 가장 바람직하게는 20%(v/v)로 함유될 수 있다.

The preferably the mesenchyme stem cell culture material is done by 10~50 % (v/v) in the composition for the stability enhancement of the stem cell for example, it has of the invention with number. More preferably, it is done by 10~30 % (v/v) it has with number. And it more preferably is done by 20 % (v/v) it has with number.

본 발명에 있어서, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 함유된 기제로써, 일반적으로 사용되는 기체인 생리식염수, 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline)을 사용할 수 있다. 이 외에 당해업계에서 일반적으로 쓰이는 기제라면 무언을 사용할든 무방하다.

In the present invention, the saline solution called the base which is generally used as the base contained in the composition for the stability enhancement of the stem cell, the Hartmann -D solution, and the PBS (Phosphate Buffered Saline) can be used. Besides, in concerned business field, whatever it uses if it is the used base generally it is acceptable.

본 발명에 의하여 수득된 중간엽 줄기세포 배양물은, 중간엽 줄기세포가 고농도로 분비하는 이하와 같은 단백질 성분을 함께 함유하고 있을 수 있다:

The mesenchyme stem cell together contains the protein component like this to the high concentration the mesenchyme stem cell culture material obtained with the invention secretes :

TGF	TGF
bFGF	bFGF
IGF	IGF
KGF	KGF
HGF	HGF
Fibronectin	Fibronectin
VEGF	VEGF
Procollagen	Procollagen

상기 TGF-β (Transforming growth factor-β; 형질변환 성장인자)는 배아에서 조직발생 형태 형성, 분화와 증식, 세포 사멸 등에 영향을 주며 성체에서는 상처받은 조직의 복구, 면역 세포의 증식 조절 등의 기능을 한다.

In the TGF-β (transforming growth factor-β: character conversion wife's father person) is the embryo bud, it functions of the recovery of the organization, which is wounded in adult while affecting the histogenesis morphogenesis, the differentiation and proliferation, the apoptosis etc. the proliferation control of the immu

nocyte etc.

IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1; 인슐린 유사 성장인자)는 70개의 아미노산으로 형성된 7.6kD의 단일 사슬 폴리펩타이드 호르몬으로, 성장호르몬에 반응하여 뼈, 근육, 신경 조직을 형성하고 다양한 조직에서 세포의 분화를 자극함으로써 손상된 세포를 재생시키고 성장을 촉진하는 역할을 한다.

It reacts to the growth hormone to the single chain motilin of 7.6kD in which the IGF-I (insulin-like Growth Factor-1: insulin-like growth factor) is formed with the amino acid of 70 and bone, the muscle, and the neural system are formed and the specialization of the cell is stimulated in various organizations the damaged cell serves to be revived and growth serves to be promoted.

HGF (hepatocyte growth factor; 간세포성장인자)는 대개 피부, 뼈, 혈액, 신경조직의 세포성장, 분열을 조절하기 위해 몸에서 생산하는 호르몬들의 복합군으로 구성되어 있으며, 세포의 분열, 재생 및 세포이동을 조절하여 흉터나 화상, 필링으로 인해 손상된 피부의 회복에 탁월한 효과가 입증되고 있다. HGF는 새로운 세포생산을 활성화하도록 유도하거나, 다른 기능을 가지는 새로운 세포를 생산하여 TGF 와 Epidermal Growth Factor 같이 외과적 상처 치유에 중요한 역할을 한다.

The HGF (hepatocyte growth factor: hepatocyte growth factor) is comprised of usually, the cell growth of the skin, bone, blood, neural system, and the composite group of the hormones. And the fission of the cell, and regeneration and cell migration are controlled and the remarkable effect is proved in the recovery of the skin damaged due to the scar or the image, and the filling. The composite group of the hormones produces in the condition in order to control the fission. HGF play a role of producing and being important like TGF and Epidermal Growth Factor in the surgical wound healing the new cell which induces in order to activate the new cell production or has the other function.

VEGF (vascular endothelial growth factor; 혈관내피 성장인자)는 모세혈관에서 혈장단백질을 투과를 증가시키는 cytokine으로 세포의 분열과 이동을 촉진시키며 세포의 재구성을 일으키는 단백질분해효소를 유도하는 기능을 가진다. 또한 세포소멸의 억제를 통해 새로 형성된 혈관의 생존을 유지시키며 신경세포의 항원 제공 억제하여 면역조절을 담당하여 세포의 성장 및 분열을 유도한다. 혈관세포의 이동을 촉진시켜 새로운 세포의 발생 및 분화를 촉진시켜 세포의 구성을 증가시킨다.

The VEGF (vascular endothelial growth factor: vascular endothelial growth factor) has the function of inducing the proteinase causing the reconfiguration of the cell while accelerating the fission and movement of the cell to the cytokine increasing penetration the plasma protein in the capillary vessel. Moreover, while maintaining the alive of the blood vessel newly formed through the suppression of the apoptosis it controls with the antigen presentation of the nerve cell and the immune-modulating is taken charge of and the outgrowth and fission of the cell are induced. The movement of the blood vessel cell is accelerated and the generation and differentiation of the new cell are accelerated and the configuration of the cell is increased.

Procollagen(프로콜라겐)은 피부의 진피층을 구성하는 단백질 성분으로 수분과 결합해 피부의 촉촉함과 탄력을 유지하는 기능을 하는 성분이다.

The Procollagen is the dermal layer of skin may be referred to the component which combines with the protein component which organizes with moisture and which functions to maintain the elasticity of skin is dampish.

본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포로 구성된 군에서 선택되는 중간엽 줄기세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포의 유래원인 지방조직의 획득이 비교적 용이하므로, 줄기세포의 제조가 경제적인 지방 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.

In the present invention, the mesenchyme stem cell may be the mesenchyme stem cell selected from group comprised of the umbilical cord originated mesenchyme stem cell, the umbilical cord blood originated mesenchyme stem cell, the bone marrow originated mesenchyme stem cell, the fat originated mesenchyme stem cell, the muscle originated mesenchyme stem cell, the amnion originated mesenchyme stem cell and placenta originated mesenchyme stem cell. Preferably, relatively the acquisition of the adipose tissue called the origin of the cell is facilitated. Therefore whether the manufacture of the stem cell is economic or not can be the room originated mesenchyme stem cell.

본 발명에 있어서, 줄기세포의 안정성 증진용 조성물은, 그 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 항황(술풀)환원제, 산화방지제 등

According to the formulation, in the present invention, the composition for the stability enhancement of the stem cell does if necessary, it appropriately can add the sulfur reducing agent, the antioxidant etc. with suspen

을 적절히 첨가할 수 있다.

현탁제의 예로는, 메틸셀룰로오스, 폴리소르베이트 80, 히드록시에틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트라간트말, 카르복시메틸셀룰로스나트륨, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 등을 들 수 있다.

용액보조제로는, 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 폴리소르베이트 80, 니코틴산아미드, 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트, 매크로골, 피마자유지방산에틸에스테르 등을 들 수 있다.

안정화제로는, 덱스트란 40, 메틸셀룰로오스, 젤라틴, 아황산나트륨, 메타황산나트륨 등을 들 수 있다.

등장화제로는, 예를 들어 D-만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있다.

보존제로는, 예를 들어 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산에틸, 소르브산, 페놀, 크레졸, 클로로크레졸 등을 들 수 있다.

흡착방지제로는, 예를 들어 인간혈청알부민, 레시틴, 덱스트란, 에틸렌옥사이드프로필렌옥사이드 공중합체, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 폴리에틸렌글리콜 등을 들 수 있다.

항황환원제로는, 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,  $\alpha$ -토코페롤, 아세트산토코페롤, L-아스코르브산 및 그 염, L-아스코르브산팔미테이트, L-아스코르브산스테아레이트, 아황산수소나트륨, 아황산나트륨, 갈릭산트리아밀, 갈릭산프로필 또는 에틸렌디아민4아세트산나트륨(EDTA), 피로인산나트륨, 메타인산나트륨 등의 킬레이트제를 들 수 있다.

본 발명은 다른 관점에서, 상기 줄기세포의 안정성 증진용 조성물을 포함하는 세포치료제 주사제품을 제공한다. 상기 세포치료제 주사제품은 일반적으로 세포치료에 사용되는 화합물을 포함할 수 있으며, 또한 세포치료제의 주요 성분인 줄기세포 또는 그의 아군(sub-population)인 성체 줄기세포를 포함할 수 있다. 상기 줄기세포는 계대 배양 또는 미계대 배양한 세포일 수 있으며, 바람직하게는 자가 조직 유래의 줄기세포, 가장 바람직하게는 자가 지방 조직 유래의 중간엽 줄기세포일 수 있다.

sion agent, solubilizing agent, stabilizer, isotonicising agent, preserver, anti-absorption agent, surface activation agent, diluent, diluting agent, PH adjusting agent, analgesia agent, buffer agent.

For example, the methyl cellulose, polysorbate 80, hydroxyethyl cellulose, arabian gum, tragacanth gum, carboxymethylcellulose sodium, the polyoxyethylene sorbitan mono laurate etc can be given of the suspension agent.

The polyoxyethylene hardened castor oil, polysorbate 80, nicotinic acid amide, polyoxyethylene sorbitan mono laurate, macro valley, the castor oil fatty acid ethyl-ester etc can be given about the solution supplemental agent.

The dextran 40, methyl cellulose, gelatin, sodium sulfite, the meta sodium sulfate etc can be given about the stabilizer.

For example, the D-mannitol, the sorbitol etc. can be given about the isotonicising agent.

For example, the paraoxybenzoic acid methyl, paraoxybenzoateethyl, sorbic acid, phenol, cresol, the chlorocresol etc can be given about the preserver.

For example, the human serum albumin, lecithin, dextran, ethyleneoxidepropyleneoxide 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, flavonoid, thioglycolic acid, thiodiglycolic, thio ethanolamine, thio glycerol, 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-hydroxyanisole,  $\alpha$ -tocopherol, acetic acid tocopherol, L-ascorbic acid and salt, the L-ascorbic acid palmitate, L-ascorbic acid stearate, sodium bisulfite, sodium sulfite, gallic acid tri amyl, gallic acid propyl or the ethylenediamine tetraacetic acid sodium (EDTA), the sodium pyrophosphate, the sodium metaphosphate etc. can be given about the antioxidant.

The invention provides the cell therapy product injection product including the composition for the stability enhancement of the stem cell in the other point of view. The cell therapy product injection product comprises the compound used in generally, the cytotherapy. And the stem cell called moreover, the principal component of the cell therapy product or the adult stem cell called its subclass (sub-population) is include might. The stem cell may be preferably, the person is the stem cell of the origin of organization, more preferably, the mesenchyme stem cell of the autologous fat origin of org

anization it can be the subculture or the cell cultivated with the U.S. passage.

본 발명에 따른 주사제품은 환자의 체질 및 결함의 종류에 따라 당 업계에 통상적으로 알려진 분량을 취하여 충전된 주사의 형태로 제조될 수 있다.

According to the injection product according to the present invention is the kind of the constitution of the patient and deformity, it can be manufactured in the form of the injection taking the amount which generally is known to the relevant industry and is charged.

본 발명에 따른 주사제품은 치료하고자 하는 결함에 인접한 부위 또는 결함부위에 주사되어 이용될 수 있으며, 이러한 방법으로 교정될 수 있는 결함은 주름, 탄살, 흉터, 피부함몰, 입술형성부전, 치주 결함, 연부 조직 결함, 뼈 결함, 화상, 피부궤양 등이다.

The injection product according to the present invention may be the deformity which is scanned to the site or the defect site adjacent to the deformity to cure and it can be used and can be corrected to this method. Is the wrinkle, the striae distensae, the scar, the skin subsidence, the lip type part former, the fang deformity, the edge tissue binding, the bone deformity, the image, the skin ulcer etc.

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 해석되지 않는 것은 당업계에서 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.

### 도면에 대한 간단한 설명

도 1은 4℃에서 3일간 배양한 세포를 100배 배율로 나타낸 사진이다.

도 2는 4℃에서 배양물 농도에 따른 기간별 세포생존율(viability)를 나타낸 그래프이다.

도 3은 37℃에서 3일간 배양한 세포를 100배 배율로 나타낸 사진이다.

도 4는 37℃에서 배양물 농도에 따른 기간별 세포생존율(viability)를 나타낸 그래프이다.

도 5는 37℃에서 세포 배양배지와 20% 배양물 농도에 각각 배양된 세포의 기간별 세포생존율(viability)를 나타낸 그래프이다.

도 6은 중간엽 줄기세포의 배양시간 (1 내지 9일)에 따른 프로콜라겐의 분비농도를 나타낸 그래프이다.

### Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph showing the cell in terms of the hundredfold magnification in 4℃, it cultivates with 3 days.

Figure 2 is graph showing the period cell viability according to the culture material concentration in 4℃.

Figure 3 is a photograph showing the cell in terms of the hundredfold magnification in 37℃, it cultivates with 3 days.

Figure 4 is graph showing the period cell viability according to the culture material concentration in 37℃.

Figure 5 is graph showing the period cell viability of the respective cultivated cell in the cell culture medium and 20% culture material concentration in 37℃.

Figure 6 is graph showing the secretion concentration of the procollagen according to the incubation time (1 through 9) of the mesenchyme stem cell.

### 실시예

#### 인간 지방조직으로부터 중간엽 줄기세포의 분리

지방흡입을 통해 복부에서 채취된 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐분해효소 타입1 (1 mg/ml)을 첨가한 DMEM배지를 사용하여 37℃에서 2시간 동안 분해하였다. 다음으로, PBS로 세척한 후, 1000 rpm에서 5분

### Example(s)

The secretion chest of the procollagen among the component according to the incubation time is the analysis .

It is predicted to contribute to enhance the survival rate of the stem cell in which the component which the mesenchyme stem cell culture material included in the composition for the stability enhancement of the stem

간 원심분리 하였다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 µm 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 세척하였다. 그 후, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산, 0.09 mM 칼슘, 5 ng/ml rEGF, 50 µg/ml BPE, 5 µg/ml 인슐린 및 74 ng/ml 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 다분화능 줄기세포를 분리하였다.

**중간엽 줄기세포 배양물의 제조**

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 90% confluency로 배양한 후, NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지로 교환하여 120시간 배양하였다.

배양 후 배지를 수거하여 원심분리를 1500 rpm에서 5분 동안 한 후, 0.22 µm 필터를 이용하여 세포 debris를 제거하여, 중간엽 줄기세포 배양물을 수득하였다.

**4℃에서 배양물 농도에 따른 줄기세포의 생존을 비교 측정**

주사를 통해 투여하게 될 때까지 4℃ 내외의 온도에서 냉장 보관하게 되는 냉장제형 세포치료제 주사제품에 사용되는 줄기세포의 생존율을 비교하기 위하여, 실시예 2의 방법에 따라 수득된 중간엽 줄기세포 배양물을 포함하는 부형제 조성물에 부유된 줄기세포의 생존율과 일반적인 등장액(saline) 용액에 부유된 줄기세포의 생존율을 비교하는 실험을 하였다.

우선 성체 줄기세포를 준비하기 위하여 실시예 1의 방법으로 줄기세포를 준비하여 PBS로 1번 세척하였다. 그 후 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 생리식염수(saline)과 함께 혼합

cell of the present invention contains is included in the scanning cell therapy product. Therefore, according to the incubation time of the mesenchyme stem cell, the concentration of the protein component like the TGF, BFGF, IGF, KGF, HGF, fibronectin, VEGF, procollagen would be changed. And in order that the optimal incubation time was confirmed the secretion concentration of the procollagen according to the incubation time was confirmed.

The mesenchyme stem cell culture material the cell debris is removed to the second using 0.22 µm filter the culture medium is taken away in the keratinocyte -SFM culture medium 30 ml containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, insulin the adipose tissue originated mesenchyme stem cell separated from the embodiment 1 and the head computerized axial tomography after doing cultivation and the centrifugation is performed in 1500 rpm to the first for 5 minutes may be obtained. Thereafter, the culture material was analyzed to the enzyme-linked immunosorbent assay method and the concentration of the procollagen was measured. The enzyme-linked immunosorbent assay performed using the kit of the lower part table 4.

Consequently, it confirmed to be included to the concentration which was more than 4000ng / ml called the concentration as shown in it shows up in the table 5 and fig. 6 in which the concentration of the procollagen confirmed in the culture material of each point of time begins to be enhanced from 3 and which 6 do after especially, 4. In the culture material of 8 primary, 799 5.9ng / ml which was the highest concentration was confirmed. And it confirmed to be again decreased to the after. Therefore, preferably, more preferably, more preferably, the time to cultivate the mesenchyme stem cell confirmed 8 entrusting with 4 through 9.

Cultivation days (Task)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Procollagen concentration(ng/ml)	119	175	345	459	545	637	724	799	732
	9.7	6.1	6.1	5.0	6.3	8.7	0.4	5.9	3.8

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

하여 대조군(control; saline 100%), 10%, 20%, 30%, 40%, 50% v/v)로 나누어 실험 군당 2 x 10<sup>6</sup> cell / 200 μl 의 세포 농도로 vial을 준비하였다. 이를 냉장제형의 일반적인 온도인 4℃에서 두어 3일째에 사진을 찍고 (도 1), 7일, 10일 간격으로 세포 생존율을 측정하였다.

세포 생존율의 측정은 가라앉은 세포를 풀어주기 위해 손가락으로 vial 밑부분을 쳐서 세포를 풀어주고 피펫팅(pipetting) 해준 후, Trypan blue와 1:1로 희석하여 Invitrogen사(社)의 Countess™ Automated Cell Counter를 사용하여 생존율을 측정하였다.

그 결과, 표 1에 나타난 것과 같이, 20% 농도로 중간엽 줄기세포 배양물을 혼합하였을 때 7일에 86%의 세포 생존율을 보여 75%인 대조군(Saline)과 차이를 보였고, 특히 10일째에는 여전히 84%의 생존율을 유지하고 있는데 비해 대조군은 62%로 생존율이 떨어져 장기간 생존율이 현저히 차이 난다는 것을 확인하였다(도 2). 7일차 결과에 따라 중간엽 줄기세포 배양물의 바람직한 함유 농도는 10~50%, 더욱 바람직하게는 10~30%, 가장 바람직하게는 20%임을 확인하였다.

온도4℃배양물 농도대조군10%20%30%40%50%0일98.8%98.8%98.8%98.8%98.8%98.8%7일75%85%86%85%83%78%10일62%80%84%74%76%71%

### 37℃에서 배양물 농도에 따른 줄기세포의 생존율 비교 측정

일반적으로 생체의 온도인 37℃ 부근에서 줄기세포의 대사가 가장 활발하게 일어나므로, 빠른 시간 안에 세포의 생존율이 대조적으로 나타날 수 있음에 착안하여, 가속조건 37℃에서 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 포함하는 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 부유된 줄기세포의 생존율과 일반적인 기체인 saline 용액에 부유된 줄기세포의 생존율을 비교하는 실험을 하였다.

우선 성체 줄기세포를 준비하기 위하여 실시예 1의 줄기세포를 준비하여 PBS로 1번 세척하였다. 그 후 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 생리식염수(saline)과 함께 혼합하여 대조군(control; saline 100%), 10%, 20%로 나누어 실험 군당 2 x 10<sup>6</sup> cell / 200 μl 의 세포 농도로 vial을 준비하였다. 이를 37℃에서 두어 3일째에 사진을 찍고(도 3), 7일, 10일 간격으로 세포 생존율을 측정하였다.

세포 생존율의 측정은 가라 앉은 세포를 풀어주기 위해 손가락으로 vial 밑부분을 쳐서 세포를 풀어주고 pipetting 해준 후, Trypan blue와 1:1로 희석하여 Invitrogen社의 Countess™ Automated Cell Counter를 사용하여 생존율을 측정하였다.

그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 20% 농도로 중간엽 줄기세포 배양물을 혼합하였을 때 7일에 59%의 세포 생존율을 보여 48%인 control과 차이를 보였고, 특히 10일째에는 여전히 55%의 생존율을 유지하고 있는데 비해 control은 36%로 생존율이 떨어져 장기간 생존율이 현저히 차이 난다는 것을 확인하였다(도 4). 이 결과에 따라 37도 조건에서 최적의 농도는 10~20%, 바람직하게는 20%임을 확인하였다.

온도37℃배양물 농도대조군5%10%20%0일차88%88%88%88%7일차48%57%68%59%10일차36%44%43%55%

### 37℃에서 일반배지와 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에서의 생존을 비교 측정

일반적으로 세포 배양에 사용되며, 주사용 세포치료제의 기제로 포함되는 무혈청 DMEM배지에서 생존율과 배양물 포함 조성물에서의 생존율을 비교하여 보기 위하여, 아래 방법으로 생존율을 비교 측정하였다.

우선, 실시예1의 줄기세포를 준비하여 PBS로 1번 세척하였다. 그 후 실시예 2의 중간엽 줄기세포 배양물을 생리식염수 (saline)과 함께 혼합하여 20%(v/v)조성물을 준비하고, 같은 부피의 무혈청 DMEM 세포배양배지를 준비하여 실험 군당  $2 \times 10^6$  cell / 200  $\mu$ l 의 세포 농도로 vial을 준비하였다. 이를 섭씨 37도에서 0일, 7일, 10일 간격으로 세포 생존율을 측정하였다.

세포 생존율의 측정은 가라앉은 세포를 풀어주기 위해 손가락으로 vial 밑부분을 쳐서 세포를 풀어주고 pipetting 해준 후, Trypan blue와 1:1로 희석하여 Invitrogen社의 Countess™ Automated Cell Counter를 사용하여 생존율을 측정하였다.

그 결과, 도 5 및 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 배양물 20%(v/v) 조성물은 10일차에도 83%의 생존율을 보이는데, 기존의 무혈청 세포배양배지를 이용할 경우, 10일차에는 33%, 7일차에도 39%만 생존함을 확인하여, 본 발명에 따른 줄기세포의 안정성 증진용 조성물의 우수성을 확인하였다.

0일차 7일차 10일차 무혈청 세포배양배지 95% 39% 33% 배양물 20%(v/v) 조성물 95% 90% 83%

### 배양시간에 따른 성분 중 프로콜라겐의 분비농도 분석

본 발명의 줄기세포의 안정성 증진용 조성물에 포함되는 중간엽 줄기세포 배양물이 함유하고 있는 성분이 주사용 세포치료제에 포함된 줄기세포의 생존율을 높이는데 기여할 것으로 예측된다. 따라서, 중간엽 줄기세포의 배양시간에 따라 TGF, bFGF, IGF, KGF, HGF, Fibronectin, VEGF, Procollagen과 같은 단백질 성분의 농도가 달라질 것인 바, 최적의 배양시간을 확인하기 위해, 배양시간에 따른 프로콜라겐의 분비농도를 확인하였다.

상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 NAC, 아스코르브산, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배양배지 30 ml에 배양한 후, 배지를 수거하여 1차로 원심분리를 1500 rpm에서 5분 동안 실시하고, 2차로 0.22  $\mu$ m 필터를 이용하여 세포 debris를 제거하여, 중간엽 줄기세포 배양물을 얻었다. 그 후 배양물을 ELISA 방법으로 분석하여 프로콜라겐의 농도를 측정하였다. ELISA 분석은 아래 표 4의 키트를 이용하여 수행하였다.

항목품명 catalog#. 제조회사/판매회사 1 VEGF ELISA kit DV E00R0026#D/웅비메디텍 2 TGF-b ELISA kit DB100BR0026#D/웅비메디텍 3 HGF ELISA kit DHG00R0026#D/웅비메디텍 4 FGF ELISA kit DFB50R0026#D/웅비메디텍 5 IGF-I ELISA kit DG100R0026#D/웅비메디텍 6 KGF/FGF-7 ELISA kit DKG00R0026#D/웅비메디텍 7 PDGF-AB ELISA kit DHD00BR0026#D/웅비메디텍 8 EGF ELISA kit DEG00R0026#D/웅비메디텍 9 FN-y ELISA kit DIF50R0026#D/웅비메디텍 10 GM-CSE ELISA kit DGM00R0026#D/웅비메디텍 11 SDF-1a ELISA kit

DSA00R0026#D/웅비메디텍12TNF- $\alpha$  ELISA kitDTA00CR0026#D/웅비메디텍13AdiponectinDRP300R0026#D/웅비메디텍14IL-1 ELISA kitDLA50R0026#D/웅비메디텍15IL-2 ELISA kitD2050R0026#D/웅비메디텍16IL-4 ELISA kitD405OR0026#D/웅비메디텍17IL-6 ELISA kitD6050R0026#D/웅비메디텍18IL-8 ELISA kitD8000CR0026#D/웅비메디텍19IL-10 ELISA kitD1000BR0026#D/웅비메디텍20IL-12 ELISA kitD1200R0026#D/웅비메디텍21Procollagen ELISA kitMK101Takara/Takara Korea

그 결과, 표 5 및 도 6에서 나타난 바와 같이, 각 시점의 배양물에서 확인되는 프로콜라겐의 농도는 3일부터 높아지기 시작하여, 특히 4일 이후로는 바람직한 농도인 4000ng/ml를 상회하는 농도로 포함되는 것을 확인하였다. 8일차의 배양물에서 가장 높은 농도인 7995.9ng/ml가 확인되었으며, 그 이후로는 다시 낮아지는 것을 확인하였다. 따라서, 중간엽 줄기세포를 배양하는 시간은 바람직하게는 4 내지 9일, 더욱 바람직하게는 7 내지 9일, 가장 바람직하게는 8일임을 확인하였다.

배양일수(일) 1 2 3 4 5 6 7 8 9  
프로콜라겐 농도(ng/ml) 1199.71756.13456.14595.05456.36378.77240.47995.97323.8

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부한 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 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 불일치 등에 대하여 본원은 법적 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.)