

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/074 C12N 5/0775 A61K 35/12
Published Date	20141201
Registration No.	1014674810000
Registration Date	20141125
Application No.	1020130041022
Application Date	20130415
Unexamined Publication No.	1020130116213
Unexamined Publication Date	20131023
Priority Claims	1020120038828 20120413 KR
Requested Date of Examination	20131113
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	RA,JUNG-CHAN Kang, Sung Keun Shin, Il Seob

발명의 명칭

줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법 및 조성물

Title of Invention

The fracturing of the stem cell and cohesion prevention method and composition.

요약

본 발명은 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 이송이나 보관 중 세포의 파쇄 및 응집을 방지할 수 있어, 투여된 줄기세포가 안정적으로 표적 조직에 도달하여 활성을 나타내는 효능을 보다 효율적으로 높일 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.



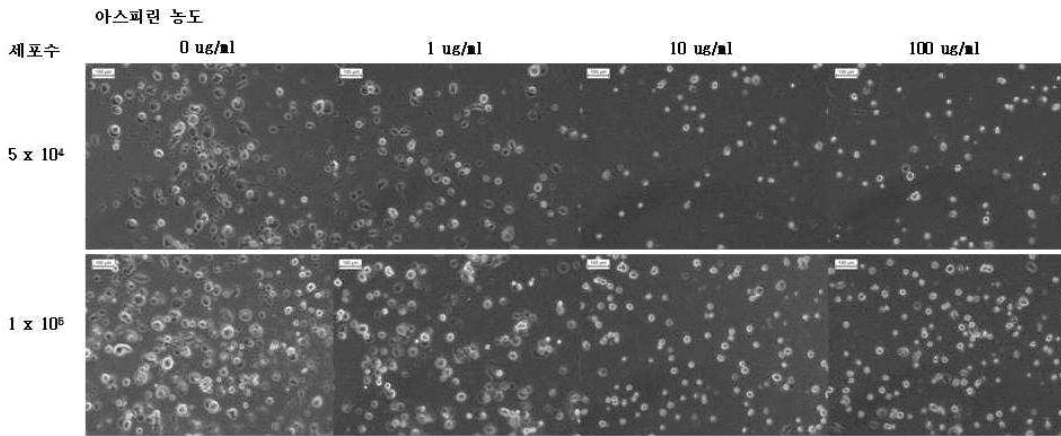
Abstract

The invention relates to the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell. The invention relates to the stem cell composition for the vein dosage in which moreover, the stem cell is floated in the aspirin contain solution. The invention relates to the composition for the fracturing of the stem cell in which moreover, the stem cell is floated in the aspirin contain solution or the cohesion prevention.

According to the invention, the cytotherapy effect using the stem cell the fracturing and coherence of the cell can be prevented among the transfer or storage can be conspicuously made promoted.



대표도면 (Representative drawing)



청구의 범위

Scope of Claims

청구 1항:

줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

Claim 1:

The fracturing and cohesion prevention method of the stem cell including the step of floating in the aspirin contain solution the stem cell.

청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 아스피린은 이소소르비드 기재 아스피린 또는 니코틴산 기재 아스피린 화합물 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

Claim 2:

As for claim 1, the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell selected from the aspirin is the isosorbide basic material aspirin or the nicotinic acid basic material aspirin compound.

청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 아스피린 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

Claim 3:

As for claim 1, the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell 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 4항:

제1항에 있어서, 상기 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

Claim 4:

As for claim 1, the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell called the content of the aspirin is 0.0001 through 0.01 mg/ml.

청구 5항:

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

Claim 5:

As for claim 1, the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell called the stem cell is the adult stem cell.

청구 6항:

제5항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법.

Claim 6:

As for claim 5, the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell.

청구 7항:

줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

Claim 7:

The stem cell composition for the vein dosage in which the stem cell is floated in the aspirin contain solution.

청구 8항:

Claim 8:

제7항에 있어서, 상기 아스피린은 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구 9항:

제7항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구 10항:

제9항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물.

청구 11항:

줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

청구 12항:

제11항에 있어서, 상기 아스피린 함유 용액은 생리식염수, 하트만-D 용액 및 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 구성된 군에서 선택되는 용액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

청구 13항:

제11항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

청구 14항:

제13항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물.

기술분야

본 발명은 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 이송/보관 중 세포가 깨지거나 세포 간 응집(aggregation)을 형성하지 않도록 하는 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지하는 방법에 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 분

As for claim 7, the stem cell composition for the vein dosage containing the solution selected from group comprised of the aspirin the contain solution is the saline solution, and the Hartmann -D solution and PBS (Phosphate Buffered Saline).

Claim 9:

As for claim 7, the stem cell composition for the vein dosage called the stem cell is the adult stem cell.

Claim 10:

As for claim 9, the stem cell composition for the vein dosage called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell.

Claim 11:

The composition for the fracturing of the stem cell in which the stem cell is floated in the aspirin contain solution or the cohesion prevention.

Claim 12:

As for claim 11, the composition for the fracturing of the stem cell 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) or the cohesion prevention.

Claim 13:

As for claim 11, the composition for the fracturing of the stem cell called the stem cell is the adult stem cell or the cohesion prevention.

Claim 14:

As for claim 13, the composition for the fracturing of the stem cell called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell or the cohesion prevention.

Technical Field

The invention relates to the method capable of preventing the fracturing and coherence of the stem cell in which the cell becomes broken as the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell among more detailed transfer / storage or which does not form the coherence (aggregation) which the cell goes.

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, an

류할 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 줄기 세포라 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#조직 대체치료법으로 대체될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

이에, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기 세포(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).

그러나 신체 내 투여에 적합한 안전성이 우수한 줄기세포를 제조하는 방법에 대한 기술은 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.

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 replaced with the cell · organization substitution value cure which with being fine 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.

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 for improving the mesenchyme stem cell separated from the human body in order to be suitable for the treatment (WO 2006/019357, KR0795708 B, and KR0818214 B).

But the stem cell with an excellent safety which is suitable for inside of body the administration may be referred to the technology about the method, for manufacturing so far, the research is the unsatisfactory condition.

이에, 본 발명자들은 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 경우, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지가 가능하다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, it confirmed that the case where the inventors floated the stem cell in the aspirin contain solution, and the fracturing and cohesion prevention of the stem cell were possible and the invention was completed.

발명의 내용

Summary of Invention

해결하고자 하는 과제

Problem to be solved

본 발명의 목적은 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법을 제공하는데 있다.

This Purpose of the invention is to provide the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell.

본 발명의 다른 목적은 혈관 투여용 줄기세포 조성물을 제공하는데 있다.

It is another object of the present invention to provide the stem cell composition for the vein dosage.

본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물을 제공하는데 있다.

It is still another object of the present invention to provide the composition for the fracturing of the stem cell or the cohesion prevention.

과제해결 수단

Means to solve the problem

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법을 제공한다.

To accomplish the above objects, the invention provides the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell including the step of floating in the aspirin contain solution the stem cell.

본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.

The invention also provides the stem cell composition for the vein dosage in which the stem cell is floated in the aspirin contain solution.

본 발명은 또한, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물을 제공한다.

The invention also provides the composition for the fracturing of the stem cell in which the stem cell is floated in the aspirin contain solution or the cohesion prevention.

발명의 효과

Effects of the Invention

본 발명에 따르면, 이송이나 보관 중 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지할 수 있어, 신체 내 투여에 적합한 안전성이 우수한 줄기세포를 얻을 수 있으므로 줄기세포의 투여에 의한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

According to the invention, the cytotherapy effect by the administration of the stem cell can be conspicuously made promoted since obtaining stem cell with an excellent safety preventing the fracturing and coherence of the stem cell among the transfer or storage and is suitable for inside of body the administration.

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 이하에 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, in the experimental method in the glossology used in this specification and less than is this technical field, it is well known and generally it is used.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#줄기세포(stem cell)#34#란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는

In the present invention, while having the self copy ability the term " stem cell " used means the step that

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 조직 유래 중간엽 줄기세포#34#란 지방조직에서 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에 축약하여 #34#지방 유래 성체 줄기세포#34#, #34#지방 줄기세포#34# 또는 #34#지방 유래 줄기세포#34#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.

본 발명에서, #34#이송#34#이란 줄기세포 자체 또는 줄기세포를 함유하는 용액을 담은 용기 등을 자동차 등의 교통 수단에 의하여 운송하는 것을 의미하며, #34#보관#34#이란 실온에서 보관하는 것 이외, 냉장에서의 보관도 포함한다.

본 발명에서, #34#줄기세포의 파쇄 및 응집 방지#34#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.

줄기세포는 다양한 방법, 예를 들면, 정맥내, 동맥내 또는 복강내 투여 등의 방법으로 신체 내로 투여될 수 있는데 그 중에서도 정맥 내 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. 먼저, 줄기세포는 단세포 형태로 혈관 내에 투여되어야 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

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, 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 and it names as the " fat originated adult stem cell ", and the " adipose stem cell " or the " 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.

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

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 penuriously maintain the form. For example, it can mean that the cell membrane of the stem cell becomes broken or the coherence (aggregation) which the cell goes is not formed among the transfer or storage and the single cell form is maintained.

It can be injected to the method including the intraarterial or the intraperitoneal administration etc. within thin body but even when being convenient the disease can be among them safely cured by 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. Firstly, the stem cell has to be injected in the form of the single cell within the blood vessel. Th

cell) 형태가 아닌 응집된 줄기세포 또는 깨진 세포는 정맥 내 투여 등의 방법으로 신체에 투여되는 경우, 혈관 내피세포나 혈소판 등과 부착하여 혈류 속도를 감소시키거나 혈액 순환을 방해할 수 있으며 심지어 미세지관이나 혈관 등의 폐색을 초래할 수도 있다 (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 혈관 내로 투여되기 전 세포의 파쇄나 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. 또한, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않도록 혈관 내 투여에 적합한 크기여야 한다. 뿐만 아니라, 표적 부위에 도달한 줄기세포가 목적하는 치료효과를 나타내도록 일정 농도 이상의 세포 투여가 전제되어야 한다. 상기 여러 요건 중, 본 발명은 혈관 내로 투여되기 전 줄기세포의 파쇄 및 응집을 방지하여 신체 내 투여에 적합한 안전성이 우수한 줄기세포를 제공하기 위한 것이다.

ere 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 fracturing or the coherence (aggregation) of the cell including the case, of being injected the blood vessel endothelial cell or the platelet etc. 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. Moreover, 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. Besides, the cell administration more than the constant concentration has to be premised so that the stem cell reaching the target sites how the intended the therapeutic effect. Among the different requisite. And the present invention is to provide the stem cell with an excellent safety which prevents the fracturing and coherence of the stem cell before being injected within the blood vessel and is suitable for inside of body the administration.

본 발명은 일 관점에서, 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 파쇄 및 응집 방지 방법을 제공한다.

The invention provides the fracturing and cohesion prevention method of the stem cell including the step of floating in the aspirin contain solution the stem cell in the consistency.

본 발명에서 #34#아스피린 함유 용액#34#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 기재라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제 뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아세틸 살리실산 (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 세포 내 생존률이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 파괴나 응집 억제 효과의 효과가 미비할 수 있다.

In the present invention, the solution in which the " 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 existence 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.

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.

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.

따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 혈관 투여용 줄기세포 조성물을 제공한다.

Therefore, the present invention is to provide the stem cell composition for the vein dosage in which the stem cell is floated in the other point of view in the aspirin containing solution.

본 발명은 또 다른 관점에서, 줄기세포가 아스피린 함유 용액에 부유되어 있는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 파쇄 또는 응집 방지용 조성물을 제공한다.

The present invention is to provide the composition for the fracturing of the stem cell in which and the stem cell is floated in the other point of view in the aspirin containing solution or the cohesion prevention.

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.

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.

상기 줄기세포의 획득에 사용되는 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져있는 통상적인 배지를 사용할 수 있는데, 예를 들어 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 당해 업계에서 이용되는 배지이면 족하다. 바람직하게는, M199/F12(mixture) (GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO) 및 K-SFM로 구성된 군에서 선택된 것을 사용할 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.

It is sufficient if it is culture medium used in the business field besides it experiences the conventional culture medium which is known in the relevant industry because of being suitable for the stem cell cultivation can be used as the culture medium used in the acquisition of the stem cell and it has for example, 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). Preferably, it can use to be selected in group comprised of the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO), the MEM-alpha culture medium (GIBCO), the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Welgene), the MCDB 131 culture medium (Welgene), and the IMEM culture medium and K-SFM than. Particularly, among these, preferably, the K-SFM culture medium can be used.

상기 줄기세포의 획득에 사용되는 배지는 당 업계에 공지된, 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, 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, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

While promoting the proliferation of the divided expression type in which the culture medium used in the acquisition of the stem cell is known in the relevant industry of the 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, 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, 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.

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 :

#183#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.

#183#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 different with tyrosine kinase related receptor, the growth factor (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF), induced with 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).

#183#환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린

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

#183#gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

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

#183#조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

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

#183#변형성 성장 인자, 예컨대 TGFβ1

The deformability growth factor, for example, the TGFβ1.

#183#뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

The neurotrophin, for example, CNTF.

특히, 본 발명의 일 구체예에서 사용되는 지방 줄기세포를 수득하기 위한 배지는 NAC, 칼슘, 인슐린 및 하이드로코티손, 항산화제를 함유하는 것을 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는, FBS, NAC, 칼슘, rEGF, 인슐린, 하이드로코티손 및 항산화제 중 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지를 사용할 수 있다. 상기 항산화제는 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexanoic acid) 등에서 선택한 것을 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.

Particularly, the culture medium for obtaining the adipose stem cell used in one embodiment of the present invention may be formed of the culture medium which can use to contain NAC, calcium, insulin and hydrocortisone and more preferably, contains the component more than 2 kinds among the FBS, NAC, calcium, the rEGF, insulin, the hydrocortisone and antioxidant. The antioxidant may be formed of selenium it selects in the selenium, the ascorbic acid, the vitamin E, the catechin, the lycopene, the beta-carotene, the coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid), the DHA (docosahexanoic acid) etc than thing can be used. Selenium as the antioxidant in a preferred embodiment of the present invention may be referred to the desirable used amount of the selenium is 0.5 through 10 ng / ml it used.

본 발명의 일 실시예에서는 상기와 같은 조성의 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 분

In a preferred embodiment of the present invention, the fat originated mesenchyme stem cell was cultivated in the culture medium of the composition as described above. The fat originated mesenchyme stem cell can obtain to the method as follows. Firstly, it is indignant

해 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 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, rEGF, 인슐린 및 하이드로코티손을 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.

상기 조성의 배지에서 배양한 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.

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 해석되는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 분리된 지방조직을 PBS로 세척한 다음, 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. 100 mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5ng/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 하이드로코티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 Keratinocyte-SFM media(K-SFM)을 2일마다 교체하면서 계대배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

실시예 2: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

1-1: 줄기세포의 단일세포 (single cell) 유지 능력

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 PBS centrifuge 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 mesh it again washed to PBS. The mesenchyme stem cell while replacing the K-SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, the rEGF, 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 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.

If trypsin is processed in the stem cell cultivated in the culture medium of the composition 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.

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.

Embodiment 1: human adipose tissue originated mesenchyme stem cell separation.

The organization the using the DMEM media with the collagenase type 1 (1mg/ml) the adipose tissue is small pieces cut off the adipose tissue separated from the epididymal fat pad by the liposuction is washed to PBS was dissolved in 37℃ for 2 hours. The organization handled with collagenase for 5 minutes was centrifuged at 1000rpm 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 100 mesh-added DMEM medium.

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

Embodiment 2: human adipose tissue originated mesenchyme stem cell separation.

1- 1: the single cells 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.

실시에 1에서 분리된 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 생존률을 관찰하였다. 상기 아세틸살리실산을 첨가한 생리식염수는, 생리식염수에 아세틸살리실산을 농도별로 첨가하여 37°C에서 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 existence 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°C for 30 minutes.

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
0	1	2	5	10
12 hours	85%	50%	20%	10%
24 hours	70%	10%	10%	5%

Existence rate	Aspirin concentration(mg/10 ml)			
0	1	2	5	10
12 hours	85%	50%	20%	10%
24 hours	70%	10%	10%	5%

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 the processing.

실시에 1에서 분리된 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 12h, 24h, 48h 및 72h에서의 생존률을 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 12h, 24h, and the existence rate at 48h and 72h were observed.

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
0	0.001	0.01	0.1	1
12 hours	95%	91%	90%	90%
24 hours	90%	87%	85%	84%
48 hours	85%	80%	77%	74%
72 hours	65%	63%	61%	61%

Existence rate	Aspirin concentration(mg/10 ml)			
0	0.001	0.01	0.1	1
12 hours	95%	91%	90%	90%
24 hours	90%	87%	85%	84%
48 hours	85%	80%	77%	74%
72 hours	65%	63%	61%	61%

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 정치 가능하나, 줄기로는 24 시간 이내로 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 process within 24 hours this 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)

yl Injection) according to the concentration.

실시에 1에서 분리된 지방조직 유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 1.0×10^7 cells 농도로 부유시킨 후, 24시간 후의 생존률을 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 the existence rate after 24 hours was observed.

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
0	0.001	0.01	0.1	0.1
24 hours	95%	92%	91%	91%

Existence rate	Aspirin concentration(mg/10 ml)			
0	0.001	0.01	0.1	0.1
24 hours	95%	92%	91%	91%

실험 결과, 생리식염수 10 ml에 대하여 알타질주의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우, 지방줄기세포의 증식능력에 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 생존률을 관찰한 결과, 표4에 나타난 바와같이 86~90%의 생존률을 나타냈고 표5에 나타난 바와같이, 0.001~0.1 mg/10ml 의 아스피린 첨가에 의해 세포수의 변화는 거의 없었다.

Moreover, the cell number and the existence rate after cultivating the cell 1.0×10^6 cells floated as described above with 7 days were observed. Then as shown in the above table 5, the existence rate of 86~90% was shown and there was nearly no change of the cell number with the aspirin addition of 0.001~0.1 mg / 10ml.

003c#아스피린 농도 별 24시간 후 생존률 (n=3)003e#

생존률	아스피린 농도 (mg/10ml)			
0	0.001	0.01	0.1	0.1
LM091936 P3	90%	90%	85%	87%
LM091951 P3	91%	90%	89%	86%
LM091954 P3	92%	90%	90%	88%
평균	91±1%	90±0%	88±2.6%	87±1%

003c# aspirin chest is the existence rate after much 24 hours(n=3)003e#

Existence rate	Aspirin concentration(mg/10ml)			
0	0.001	0.01	0.1	0.1
LM091936 P3	90%	90%	85%	87%
LM091951 P3	91%	90%	89%	86%
LM091954 P3	92%	90%	90%	88%
Average	91±1%	90±0%	88±2.6%	87±1%

003c#아스피린 농도별 24시간 부유후, 배양시 증식력에 미치는 영향 (n=3)003e#

세포수	아스피린 농도 (mg/10ml)			
0	0.001	0.01	0.1	0.1
LM091936 P3	8.0×10^3	7.6×10^3	8.2×10^3	7.8×10^3
LM091951 P3	1.18×10^7	1.32×10^7	1.1×10^7	1.12×10^7
LM091954 P3	1.02×10^7	1.0×10^7	1.3×10^7	1.02×10^7

After 003c# aspirin concentration 24 hours stray,The influence had an effect on the colonization ability in cultivation(n=3)003e#

Cell number	Aspirin concentration (mg/10ml)			
0	0.001	0.01	0.1	0.1
LM091936 P3	8.0×10^3	7.6×10^3	8.2×10^3	7.8×10^3
LM091951 P3	1.18×10^7	1.32×10^7	1.1×10^7	1.12×10^7
LM091954 P3	1.02×10^7	1.0×10^7	1.3×10^7	1.02×10^7

(4) 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 처리한 줄기세포의 응집

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

실시에 1에서 분리된 지방유래 중간엽 줄기세포에 트립신 처리한 후, 알타질주 (Arthalgyl Injection)를 농도별로 첨가한 생리식염수에 부유시킨 후, 24시간 및 72시간 후의 응집 정도를 관찰하였다.

After it trypsinized in the fat 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 the degree of cohesion after 24 hours and 72 hours was observed.

oved.

그 결과, 24시간 후 대조군에서 가장 많은 응집이 관찰 되었고 알타질주의 첨가량이 0.001 내지 0.1mg인 경우, 지방줄기세포의 응집이 감소함을 확인할 수 있었다 (도 1). 저농도 (5×10^4 cells) 뿐만 아니라 고농도 (1×10^5 cells)의 줄기세포 실험군에서도 아스피린의 응집 방지 효과를 확인하였다.

Consequently, in the control group after 24 hours, in case the most many coherence was observed and the additive content of the Alta speeding was 0.001 through 0.1mg it could confirm that the coherence of the adipose stem cell reduced (fig. 1). In the lightly doped is the stem cell experimental group of not only (5×10^4 cells) but also the high concentration (1×10^5 cells), the anti-cohesion effect of the aspirin was confirmed.

72시간 후의 응집정도를 확인한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군과 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 아스피린 처리군에서 응집현상과 함께 세포의 사멸이 관찰되었지만 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 처리군에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다 (도 2).

The degree of cohesion after 72 hours was confirmed. Then the extinction of the cell was observed in the control group and $1\mu\text{g} / \text{ml}$ aspirin process group with the agglomeration but as shown in figure 2, such phenomenon was not shown in $10\mu\text{g} / \text{ml}$ emergency processing group (fig. 2).

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

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

실시에 1에서 분리된 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 세포특성을 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.

발현률	아스피린 농도 (mg/10ml)		Revelation rate Aspirin concentration(mg/10ml)		
	0	0.1	0	0.1	
CD29	99.97%	99.97%	CD29	99.97%	99.97%
CD31	0%	0.21%	CD31	0%	0.21%
CD44	99.45%	99.25%	CD44	99.45%	99.25%
CD45	0.19%	0.17%	CD45	0.19%	0.17%

실험 결과, 아스피린리신 농도에 의한 세포 생존률은 다소 감소하나 유의적이지 않았으며 5일간 배양한 후의 세포수 역시 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 *** pipe lean concentration a bit reduced but it was not the significant and it had the individual difference but there the concentration difference was nearly no cell number after cultivating with 5 liver. 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.

실험 결과, 생존률에 대한 아스피린리신의 세포독성은 나타나지 않았고, 아스피린이 첨가된 생리식염수에 지방유래 중간엽 줄기세포를 보관 할 경우 세포의 특성 변화없이 응집이 방지됨을 관찰하였다.

In case of keeping the fat originated mesenchyme stem cell in the aspirin the experimental result , and the cyto toxin of *** pipe lean about the existence rate did not show up-added saline solution it observed that coherence was prevented without the characteristics change of the cell.

이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 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 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

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

y this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.

도면에 대한 간단한 설명

도 1은 다양한 농도의 아스피린에 24시간 동안 노출시킨 줄기 세포의 응집 정도를 관찰한 사진이다.

도 2는 다양한 농도의 아스피린에 72시간 동안 노출시킨 줄기 세포의 응집 정도를 관찰한 사진이다.

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph observing the degree of cohesion of the stem cell exposed in the aspirin for 24 hours of the various concentrations.

Figure 2 is a photograph observing the degree of cohesion of the stem cell exposed in the aspirin for 72 hours of the various concentrations.

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 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.)