

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/074 C12N 5/02 C12N 5/0775
Published Date	20141201
Registration No.	1014674800000
Registration Date	20141125
Application No.	1020130042517
Application Date	20130417
Unexamined Publication No.	1020130117343
Unexamined Publication Date	20131025
Priority Claims	1020120040488 20120418 KR
Requested Date of Examination	20131113
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	RA,JUNG-CHAN Kang, Sung Keun Shin, Il Seob

발명의 명칭

혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법

Title of Invention

The manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration.

요약

본 발명은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 바람직하게는 직경이 11 내지 16 μm 인 줄기세포의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지에 관한 것이다.

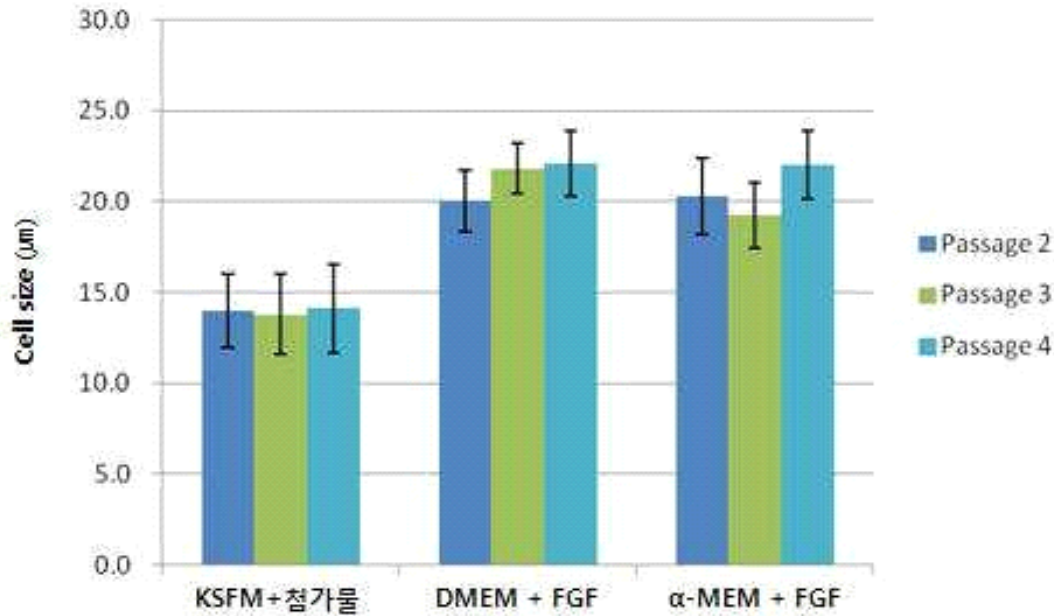
본 발명에 따르면, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포를 제조할 수 있어, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 안정적으로 표적 조직에 도달하여 활성을 나타내는 효능을 보다 효율적으로 높일 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

Abstract

The invention relates to the manufacturing method of the stem cell called the manufacturing method, preferably, the diameter is 11 through 16 μm of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration. The invention relates to the culture medium for manufacturing the stem cell having the size which is suitable for moreover, inside of the blood vessel the administration.

According to the invention, the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration the cytotherapy effect using the stem cell it can manufacture can be conspicuously made promoted.

대표도면 (Representative drawing)



청구의 범위

청구 1항:

기본 배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture) (GIBCO), MEM-alpha배지(α-Minimal Essential Medium: Welgene), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장 배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄, 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.

청구 4항:

제3항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하

Scope of Claims

Claim 1:

The manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration which comprises the basal medium and NAC (N-acetyl-L-cysteine), insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor), and the step of in the culture medium which containing, the trunk cell is cultivated the selected component more than 2 kinds in the group comprised of the antioxidant.

Claim 2:

As for claim 1, the manufacturing method of the stem cell comprising the basal medium is the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO); the MEM-alpha culture medium (α-Minimal Essential Medium: Welgene); the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Welgene), the MCDB 131 culture medium (Welgene), the IMEM culture medium (GIBCO), the K-SFM, the DMEM / F12 culture medium, the PCM culture medium; and the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration selected from the group comprised of the MSC expansion culture medium (Chemicon).

Claim 3:

As for claim 1, the manufacturing method of the stem cell comprising the antioxidant is selenium; the ascorbic acid; the vitamin E, the catechin, the lycopene, the beta-carotene, the coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid); and the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration selected from the group comprised of the DHA (docosahexanoic acid).

Claim 4:

As for claim 3, the manufacturing method of the stem

는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the antioxidant is selenium.
청구 5항:	Claim 5:
제1항에 있어서, 상기 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	As for claim 1, the manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration containing the selected component in group comprised of the culture medium is that he FBS (fetal bovin serum), and calcium and EGF.
청구 6항:	Claim 6:
제1항에 있어서, 배양된 줄기세포를 트립신으로 처리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	As for claim 1, the manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration which further comprises the step of processing as trypsin the cultivated stem cell.
청구 7항:	Claim 7:
제1항 또는 제6항에 있어서, 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	As for claim 1 or 6, the manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration which further comprises the step of floating in the aspirin contain solution the cultivated stem cell.
청구 8항:	Claim 8:
제1항에 있어서, 상기 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포는 직경이 11 내지 16 μm 인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	As for claim 1, the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration is the manufacturing method of the stem cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the diameter is 11 through 16 μm .
청구 9항:	Claim 9:
제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	As for claim 1, the manufacturing method of the stem cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the stem cell is the adult stem cell.
청구 10항:	Claim 10:
제9항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법.	As for claim 9, the manufacturing method of the stem cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell.
청구 11항:	Claim 11:
기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.	The culture medium for manufacturing the stem cell comprising the basal medium and NAC (N-acetyl-L-cysteine); insulin or the insulin pseudo element; the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor); and the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration containing the component selected from the group comprised of the antioxidant more than 2 kinds.
청구 12항:	Claim 12:
제11항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture)	As for claim 11, the culture medium for manufacturing

(GIBCO), MEM-alpha배지(α -Minimal Essential Medium: Welgene), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Dulbecco modified Eagle Medium: Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장 배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

the stem cell comprising the basal medium is the M19 9 / F 12 (mixture) (GIBCO); the MEM-alpha culture medium (α -Minimal Essential Medium: Welgene); the lightly doped is the glucose compound DMEM medium (Dulbecco modified Eagle Medium: Welgene), the MCDB 131 culture medium (Welgene), the IMEM culture medium (GIBCO), the K-SFM, the DMEM / F12 culture medium, the PCM culture medium; and the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration selected from the group comprised of the MSC expansion culture medium (Chemicon).

청구 13항:

Claim 13:

제11항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄, 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

As for claim 11, the culture medium for manufacturing the stem cell comprising the antioxidant is selenium; the ascorbic acid; the vitamin E, the catechin, the lycopen, the beta-carotene, the coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid); and the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration selected from the group comprised of the DHA (docosahexanoic acid).

청구 14항:

Claim 14:

제11항에 있어서, 상기 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

As for claim 11, the culture medium for manufacturing the stem cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the antioxidant is selenium.

청구 15항:

Claim 15:

제11항에 있어서, 상기 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

As for claim 11, the culture medium for manufacturing the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration containing the selected component in group comprised of the culture medium is the FBS (fetal bovin serum), and calcium and EGF.

청구 16항:

Claim 16:

제11항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

As for claim 11, the culture medium for manufacturing the stem cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the stem cell is the adult stem cell.

청구 17항:

Claim 17:

제16항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지.

As for claim 16, the culture medium for manufacturing the stem cell having the suitable size in the inside of the blood vessel the administration called the stem cell is the fat origin of organization mesenchyme stem cell.

기술분야

Technical Field

본 발명은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 혈관 내 투여에 적합하도록 직경이 1 내지 16 μ m인 줄기세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

The invention relates to the method for manufacturing the stem cell called the diameter is 1 through 16 μ m it is suitable for inside of the blood vessel more detailed administration as the manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration.

줄기세포(stem cell)는 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다. 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 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).

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

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

그러나, 혈관 내 투여에 적합하도록 줄기세포를 제조하는 방법에 대한 기술은 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.

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

이에, 본 발명자들은 기본 배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 경우, 혈관 내 투여에 적합한 크기의 줄기세포를 제조할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, it confirmed manufacturing the case of cultivating the trunk cell in the culture medium containing the component selected from group comprised of the inventors is the basal medium: and NAC (N-acetyl-L-cysteine), insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor) and antioxidant more than 2 kinds, and the stem cell of the size which was suitable for inside of the blood vessel the administration and the invention was completed.

발명의 내용

Summary of Invention

해결하고자 하는 과제

Problem to be solved

본 발명의 목적은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법을 제공하는데 있다.

The manufacturing method of the stem cell having the size in which this Purpose of the invention is suitable for inside of the blood vessel the administration is to be provided.

본 발명의 다른 목적은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지를 제공하는데 있다.

It is another object of the present invention to provide the culture medium for manufacturing the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration.

과제해결 수단

Means to solve the problem

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기본배지; 및 NAC (N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

To accomplish the above objects, the invention provides the manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration including the step of in the culture medium which containing, the trunk cell is cultivated the selected component more than 2 kinds in group comprised of the basal medium and NAC (N-acetyl-L-cysteine), insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor) and antioxidant.

본 발명은 또한, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지를 제공한다.

The invention provides moreover, the basal medium and NAC (N-acetyl-L-cysteine), insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor), and the culture medium for manufacturing the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration containing the selected component more than 2 kinds in the group comprised of the antioxidant.

발명의 효과

Effects of the Invention

본 발명에 따르면, 직경이 11 내지 16 μm 인 줄기세포를 제조할 수 있어, 표적 조직으로의 이동이 용이하며 안정성이 우수한 줄기세포를 제조할 수 있으므로 줄기세포의 혈관 내 투여에 의한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

According to the invention, the cytotherapy effect by inside of the blood vessel the administration of the stem cell can be conspicuously made promoted since the movement to the target tissue it can manufacture can manufacture the stem cell with an excellent stability it is facilitated the stem cell called the

diameter is 11 through 16 μm .

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#줄기세포(stem cell)#34#란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, #34#성체 줄기세포#34#는 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 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#혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포#34#란 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 흐름이나 순환을 방해하지 않으면서 표적 조직으로 용이하게 이동하여 그 활성을 나타낼 수 있도록 직경이 정맥이나 모세혈관의 직경에 비하여 작은, 바람직하게는 직경이 11 내지 16 μm 인 줄기세포를 의미한다.

줄기세포는 다양한 방법, 예를 들면, 정맥내, 동맥내 또는 복강

Description of Embodiments

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.

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, 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 stem cell " having the size which is suitable for the " blood vessel inside administration means stem cell called preferably, the diameter is 11 through 16 μm in which the diameter is small in comparison with the diameter of the vein or the capillary vessel in order not to disturb inside of the blood flow the flow or circulation and the injected stem cell easily moves to the target tissue and it shows the activity within the blood vessel.

The vein can be injected to the method including the

내 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, 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성하지 않도록 혈관 내 투여에 적합한 크기여야 한다. 다양한 조직에서 유래될 수 있는 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal stem cell)는 환자나 그 유래, 배양 상태나 방법에 따라 형태나 증식 정도가 제각각이며 그 크기도 직경이 약 10 내지 300 μm 으로 다양하다. 그러나 인간의 후모세관 정맥 (post-capillary venules)은 대략 그 직경이 10 내지 50 μm 이며, 소동맥은 직경이 8 내지 30 μm 이고 (Schmidt GT, 1989), 모세혈관은 직경이 8 μm 정도로 (Schmidt GT, 1989; Chien, 1975; John Ross, 1991; Herbert et al., 1989; Arthur and Guyton, 1997; Renkin, 1989; Gaetgens, 1980; Row 1979), 보통의 중간엽 줄기세포의 직경보다 작다. 따라서, 상대적으로 크기가 큰 중간엽 줄기세포가 정맥 내로 투여되면 혈관 내 활성에 영향을 줄 수 있다. 구체적으로, 혈류 속도를 감소시킬 수 있을 뿐 아니라, 혈액 순환을 방해하여 혈류의 중단, 혈전 형성, 혈관 폐색, 심지어 사망을 유발할 수 있다는 문제점이 있다. 이와 관련하여, 직경이 약 16 내지 53 μm 인 중간엽 줄기세포를 마우스에 정맥 내 투여시 혈류 속도가 감소되었고, 심근 경색, 혈전 형성의 유발이 관찰되었다는 보고가 있다 (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376). 따라서, 적합한 크기의 줄기세포를 혈관 내에 투여하는 것이 중요하다. 또한, 혈관 내로 투여되기 전 세포의 파쇄나 응집 (aggregation)이 형성되지 않아야 하며, 혈관 내로 투여된 후에도 단일 세포 (single cell)로서 세포의 파쇄나 응집의 형성 없이 표적 부위에 안정적으로 도달하여야 한다. 뿐만 아니라, 표적 부위에 도달한 줄기세포가 목적하는 치료효과를 나타내도록 일정 농도 이상의 세포 투여가 전제되어야 한다. 상기 여러 요건 중, 본 발명은 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가져서 혈관 내로 투여된 줄기세포가 혈류 내 속도를 감소시키거나 혈전을 형성함 없이 안정적으로 치료효과를 나타내도록 하기 위한 줄기세포를 제공하기 위한 것이다.

본 발명은 일 관점에서, 기본 배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포의 제조방법을 제공한다.

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 injected within the blood vessel is inside of the blood flow the speed may be referred to the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration in order to reduce or it does not form the blood clot. The form or the proliferating rate is the various and the mesenchyme stem cell (Mesenchymal stem cell) originating in various organizations the size the diameter is various according to the patient or the originated, and the culture state or the method to about 10 through 300 μm . But the high endothelial venule (post-capillary venules) of human is smaller than in the capillary vessel, the diameter about 8 μm (Schmidt GT, 1989; Chien, 1975; John Ross, 1991; Herbert et al., 1989; Arthur and Guyton, 1997; Renkin, 1989; Gaetgens, 1980; Row 1979), normal, the diameter of the mesenchyme stem cell the diameter as to the arterioles, is 8 through 30 μm (Schmidt GT, 1989) approximately the diameter is 10 through 50 μm . Therefore, relatively, size can affect the blood vessel skid resistant if the large mesenchyme stem cell is injected within the vein. Specifically, the blood flow rate can be reduced. In addition the circulation of the blood is disturbed and it has the abort, the thrombogenicity, the occlusion from blood vessel of the blood flow, and the problem that it even can cause death. The blood flow rate was the mesenchyme stem cell called the diameter in connection with the this, is about 16 through 53 μm reduced in the mouse in the intravenous administration. It has the report (D.Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376) that the myocardial infarction, and the induction of the thrombogenicity were observed the report (D. Furlani et al. Microvascular Research 77 (2009) 370-376) is important to administer the stem cell of the suitable size within the blood vessel. Moreover, the fracturing or the coherence (aggregation) of the cell should not be formed before being injected within the blood vessel. And the coherence (aggregation) 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. Besides, the cell administration more than the constant concentration has to be premised so that the stem cell reaching the target site show the intended the therapeutic effect. Among the different requisite. And the present invention is to provide the stem cell which has the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration and reducing inside of the blood flow the speed or in which the injected stem cell does not form the blood clot within the blood vessel and which steadily shows the therapeutic effect.

The invention provides the manufacturing method of the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration including the step of in the culture medium which containing, the trunk cell is cultivated the selected component more than 2 kinds in group comprised of the basal medium: and NAC (N-acetyl-L-cysteine) in the consistency, insulin or the

insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bF GF (basic fibroblast growth factor) and antioxidant.

본 발명에서 사용되는 기본 배지(basal medium)는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 간단한 조성을 가지는 통상적인 배지를 뜻한다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이용되는 배지라면 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게는, M199/F12 (mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.

In the present invention, the conventional culture medium having the simple composition in which the use of basal medium is known in the relevant industry because of being suitable for the stem cell cultivation is meant. Generally, it can be used without limitation if it is the culture medium used in the business field besides it experiences it has the MEM (Minimal Essential Medium), the DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), the RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), the K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium) to the basal medium used in cultivation. Preferably, it can be selected in group comprised of the M199 / F 12 (mixture) (GIBCO), the MEM-alpha culture medium (GIBCO), and the lightly doped glucose compound DMEM medium (Welgene), MCDB 131 culture medium (Welgene), IMEM culture medium (GIBCO), K-SFM, DMEM / F12 culture medium, PCM culture medium and MSC expansion culture medium (Chemicon) than. Particularly, among these, preferably, the K-SFM culture medium can be used.

상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 기본 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, FCS (fetal calf serum), horse serum, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민, L-글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오사이드 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 basal medium used in the acquisition of the mesenchyme stem cell culture material is known in the relevant industry of the mesenchyme stem cell it can be supplemented as the additive which the differentiation controls. Moreover, the culture medium can contain the neutral buffer agent (for example, the phosphate and/or the high concentration bicarbonate) among the iso-osmotic solution and protein nutrient (for example, the blood serum, for example, the FBS, the FCS (fetal calf serum), horse serum, serum replacement, albumin or the essential amino acid and non essential amino acid, for example, glutamine, and the L-glutamine). Furthermore, etc component (member of a part 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 10이상의 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 활성제

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

The different with tyrosine kinase related receptor, the growth factor (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF), induced with for example, platelet - the macrophage

인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를 위한 리간드	ge 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 TGF β 1.
#183#뉴로트로핀, 예컨대 CNTF	The · neurotrophin, for example, CNTF.
#183#항생제, 예컨대 겐타마이신 (gentamicin), 페니실린, 스트렙토마이신	The · antibiotic, for example, the Gentamicin, penicillin, and the streptomycin

본 발명에서 사용되는 배지는 상기 기본 배지 이외에, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 추가로 함유할 수 있다.

In the present invention, the component selected from group comprised of the used culture medium is the NAC (N-acetyl-L-cysteine) besides the basal medium, insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor) and antioxidant more than 2 kinds can be additionally contained.

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

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

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

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

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

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

본 발명에서 사용되는 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유할

In the present invention, the component selected from group comprised of the used culture medium is the FBS

수 있다. 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor; EGF)는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 함량이 10 ng/ml 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50 ng/ml을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포는 바람직하게는 11 내지 16 μ m의 직경을 가지므로 혈관 내 투여에 적합하다.

따라서 본 발명은 다른 관점에서, 기본배지; 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 항산화제로 구성된 군에서 선택되는 2가지 이상의 성분을 함유하는, 혈관 내 투여에 적합한 크기를 가지는 줄기세포 제조용 배지를 제공한다.

본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 배지에서 지방 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 우선, 지방흡입술(Liposuction) 등에 의해 복부로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐 분해 효소를 첨가한 DMEM배지를 사용하여 분해 후, PBS로 세척하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 100 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, 갈슘, rEGF, 인슐린 및 하이드로코르티손을 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.

본 발명의 제조방법은, 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포를 트립신으로 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 배양된 줄기세포에 트립신을 처리하면 단세포 형태의 줄기세포를 얻을 수 있는데, 이때 트립신은 세포 간의 응집을 억제하여 세포가 단세포(single cell)의 형태를 갖도록 처리되는 것으로, 세포 간의 응집 형성을 억제할 수 있는 물질이면 대체하여 사용할 수 있다.

본 발명의 제조방법은, 본 발명에 따른 배지에서 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에 부유시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 배양된 줄기세포를 아스피린 함유 용액에서 부유시키면 이송이나 보관 중 줄기세포가 파쇄되거나 응집되는 것을 방지할 수 있으므로 유용하다. 따라서, 혈관 내 투여시 사용되는 줄기세포는 아스피린 함유 생리식염수에 부유시킨 후 이용할

(fetal bovin serum), and calcium and EGF can be additionally contained. The epidermal growth factor (Epidermal growth factor: EGF) may be formed of the desirable turning point is the recombinant protein the various types of cell proliferation can be caused in vivo state. The content done with the desirable of the epidermal growth factor has the toxicity in the cell 50 ng / ml is exceeded it is 10 through 50 ng / ml and there is no effect that 10 ng / ml U.S. its content is particular.

Preferably since having the diameter of 11 through 16 μ m the stem cell cultivated in the culture medium according to the present invention is suitable for inside of the blood vessel the administration.

Therefore, the invention provides the basal medium: and NAC (N-acetyl-L-cysteine) in the other point of view, insulin or the insulin pseudo element, the hydrocortisone, and the bFGF (basic fibroblast growth factor), and the culture medium for manufacturing the stem cell having the size which is suitable for inside of the blood vessel the administration containing the selected component more than 2 kinds in the group comprised of the antioxidant.

In a preferred embodiment of the present invention, the fat originated mesenchyme stem cell was cultivated in the culture medium according to the present invention. The fat originated mesenchyme stem cell can obtain to the method as follows. Firstly, it is indignant and it washes using the DMEM medium with the collagenase the organization is small pieces cut the human adipose tissue obtained with the liposuction etc. from the abdomen is separated and it washes to PBS to after, and PBS and 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 its subcultures may be obtained. But besides, the method which is known to have in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained.

In the culture medium according to the present invention, it further can comprise the step of processing as trypsin the cultivated stem cell. If trypsin is processed in the cultivated stem cell the stem cell of the single cell form can be obtained. At this time, trypsin controls coherence between the cell and in order to have the form of the single cell the cell is processed. If it is the material suppressing the sludging between the cell it can use substitutively.

In the culture medium according to the present invention, the manufacturing method of the present invention further can comprise the step of floating in the aspirin contain solution the cultivated stem cell. Since preventing from the stem cell being crushed among the transfer or storage or being cohered if the cultivated stem

수 있다. 아스피린 함유 용액은 아스피린 화합물을 함유하는 용액을 의미하는 것으로, 용매는 바람직하게는 생리식염수를 사용할 수 있으나 그 외에도 하트만-D 용액, PBS(Phosphate Buffered Saline) 등 당업계에서 일반적으로 사용하는 기재라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 아스피린은 통상 시판되고 있는 아스피린 제제뿐 아니라 아스피린 유사 화합물을 사용할 수 있다. 상기 첨가되는 아스피린의 함량은 0.0001 내지 0.01 mg/ml인 것이 바람직하다. 첨가되는 아스피린의 양이 그보다 많으면 세포의 생존율이 감소할 수 있으며, 그보다 적으면 세포 응집 억제 효과의 효과가 미비할 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 하이드로코르티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 K-SFM(Keratinocyte Serum Free Medium)을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대 배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리하였다.

실시예 1에서 3 계대까지 배양하여 얻은 지방 유래 중간엽 줄기세포를 하기의 각 배지에 seeding하고 5일에 걸쳐 배양하였다. 5일의 배양일에 세포의 크기와 세포 특성을 측정하였다.

배지 조성

1) K-SFM+첨가물: K-SFM + FBS + NAC + 아스코르브산 + 칼슘 + rEGF

+ 인슐린 + bFGF + 하이드로코르티손 + 셀레늄

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

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 PBS after washing in 1000rpm. The supernatant was removed. The pellet for 5 minutes was centrifuged at 1000rpm to PBS after doing washing. It cultivated in 10% FBS, 2mM NAC (N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM ascorbic acid it filters in 100 mesh-added DMEM medium.

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

In the embodiment 1, the fat originated mesenchyme stem cell which cultivated to 3 passage and obtained was cultivated in below leg culture medium over seeding and 5. Size and cell property of the cell were measured in the culture date of 5.

Medium composition.

1) K-SFM+ additive: K-SFM + FBS + NAC + *** nose brew acid + calcium + rEGF.

+ insulin + bFGF + hydrocortisone + selenium.

2) DMEM+FGF: DMEM(low-glucose) + 10 % FBS + 5 ng/ml FGF

2) DMEM+FGF: DMEM(low-glucose) + 10 % FBS + 5 ng/ml FGF

3) α -MEM+FGF: α -MEM + 10 % FBS + 5 ng/ml FGF

3) α -MEM+FGF: α -MEM + 10 % FBS + 5 ng/ml FGF

배지 조성에 따른 세포 크기 (μm)

The cell size according to the medium composition(μm)

	Passage 2	Passage 3	Passage 4
KSFM+첨가물	14 #177# 2.0	13.8 #177# 2.2	14.1 #177# 2.4
DMEM+FGF	20 #177# 1.7	21.8 #177# 1.4	22.1 #177# 1.8
α -MEM+FGF	20.3 #177# 2.1	19.2 #177# 1.8	22.0 #177# 1.9

	Passage2	Passage3	Passage4
KSFM+Additive	14 \pm 2.0	13.8 \pm 2.2	14.1 \pm 2.4
DMEM+FGF	20 \pm 1.7	21.8 \pm 1.4	22.1 \pm 1.8
α -MEM+FGF	20.3 \pm 2.1	19.2 \pm 1.8	22.0 \pm 1.9

세포의 크기는 'KSFM+첨가물' 배양군의 세포가 가장 작았고, α -MEM을 basal로 하여 배양한 군들의 세포 크기가 DEME 군보다 세포 크기의 변화가 컸다. 'KSFM+첨가물'군의 세포는 계대를 거쳐도 11 ~ 16 μm 을 유지하는 것에 반해, 타배지군들은 계대가 진행될수록 20 μm 이상의 큰 세포 크기를 나타냈다 (도 1).

The size of the cell the cell of 'KSFM+ additive' cultivation group was most small. The change of the cell size of the cell size of the groups in which α -MEM was to basal and cultivated was bigger than DEME group. The cell of 'KSFM+ additive' group exhibits the large cell size more than 20 μm outcross paper groups the passage is progressed it is obvious to maintain Figure 11 ~ 16 μm after the passage (fig. 1).

상기 조건의 배양 배지로부터 얻은 계대 4 지방 유래 중간엽 줄기세포를 FACS 측정하여 세포 특성을 확인하였다.

The passage 4 fat originated mesenchyme stem cell obtained from the culture medium of the condition was measured with FACS and the cell property was confirmed.

	KSFM+첨가물	DMEM+FGF	α -MEM+FGF
CD 29	99.0 %	99.4 %	99.9 %
CD 90	99.7 %	99.6 %	99.6 %
CD 31	0.1 %	4.2 %	0.5 %
CD 34	0.0 %	2.3 %	0.2 %
CD 45	0.1 %	4.2 %	2.1 %

	KSFM+Additive	DMEM+FGF	α -MEM+FGF
CD29	99.0 %	99.4 %	99.9 %
CD90	99.7 %	99.6 %	99.6 %
CD31	0.1 %	4.2 %	0.5 %
CD34	0.0 %	2.3 %	0.2 %
CD45	0.1 %	4.2 %	2.1 %

상기 배지로부터 얻은 지방 중간엽 줄기세포의 특성을 확인한 결과, 줄기세포의 positive 마커 발현에는 배지에 대한 영향이 없으나 negative 마커는 'KSFM+첨가물' 배지군에서 배양한 세포보다 DMEM + FGF(%)처리된 배양 배지군의 세포에서 발현률이 좀 더 높았다 (도 2).

The property of the fat mesenchyme stem cell obtained from the culture medium was confirmed. Then the revelation rate was high in the positive marker manifestation of the stem cell than the cell in which there was no influence about the culture medium but which the negative marker cultivated in 'KSFM+ additive' medium group in the cell of the handled culture medium group (fig. 2).

실시예 1에서 분리된 줄기세포를 SEM(Scanning Electron Microscopy)으로 관찰하여 측정된 결과, 대부분의 줄기세포가 약 11 내지 16 μm 의 직경을 가지며, 세포 간 응집이 형성되지 않음을 확인할 수 있었다.

The stem cell separated from the embodiment 1 was observed to the SEM (Scanning Electron Microscopy) and the measured result, and the most of stem cells had the diameter of about 11 through 16 μm . And it could confirm that the coherence which the cell went was not formed.

실시예 2: Small size 줄기세포 제조용 배지성분의 탐색

Embodiment 2: the search of the medium component for manufacturing the Small size stem cell.

실시예 1에서 사용된 K-SFM 배지에 첨가되는 활성성분인 FBS, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, 5ng/ml 인슐린, bFGF, 하이드로코르티손 및 셀레늄(selenium) 중 하나씩을 제거한 배지를 제조하고, 상기 활성성분이 각각 제거된 배지 및 'KS

The culture medium removing one in the K-SFM culture medium used in embodiment 1 among the FBS called the added active ingredient, NAC, ascorbic acid, calcium, REGF, 5ng / ml insulin, BFGF, hydrocortisone and seleni

FM+첨가물' 군에서 지방 유래 줄기세포를 배양하였다. 상기 각각의 배지에서 3 passage까지 계대한 후 트립신을 처리한 뒤 공초점 현미경 (confocal microscope)으로 세포 직경을 측정하였다. 그 결과 셀레늄이 포함된 배지에 배양된 지방 유래 줄기세포의 크기는 11.6 ~ 16.5 μm 였으나, 셀레늄이 제거된 배지에서 배양한 줄기세포 크기는 18.1 ~ 23.9 μm 인 것을 확인할 수 있었다.

이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면에 대한 간단한 설명

도 1은 배양액과 계대에 따른 지방유래 중간엽 줄기세포의 크기를 나타낸 그래프이다.

도 2는 배양액에 따른 지방유래 중간엽 줄기세포의 마커발현을 나타내는 그래프이다.

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.)

um was manufactured. The active ingredient cultivated the adipose derived stem cell in the respective removed culture medium and 'KSFM+ additive' group. In each culture medium, the cell diameter was measured to be the confocal microscope after processing trypsin to 3 passage after the group coldest day of the year. Consequently, in the culture medium in which selenium the cultivated size of the adipose derived stem cell was 11.6 ~ 16.5 μm is removed in the culture medium containing selenium, the thing called the stem cell size cultivated is 18.1 ~ 23.9 μm could be confirmed.

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

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is graph showing the size of the fat originated mesenchyme stem cell according to the culture fluid and passage.

Figure 2 is graph showing the marker manifestation of the fat originated mesenchyme stem cell according to the culture fluid.