

## Bibliographic Data

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Int.Cl.                       | C12N 5/071   C12N 5/02   C12N 5/00                           |
| Published Date                | 20071105   |
| Registration No.              | 1007732530000  |
| Registration Date             | 20071030   |
| Application No.               | 1020070029479  |
| Application Date              | 20070326   |
| Requested Date of Examination | 20070501   |
| Agent.                        | LEECHEOYOUNG   |
| Inventor                      | RA, Jeong Chan   KIM, Bong Hui   JO, Jung Youn   KIM, Eun Ok |
| Rightholder                   | GwonRi ByeonDong ItEum                                       |

### 발명의 명칭

성체줄기세포와의 공동배양을 통한 조혈모세포의 배양 및 증식 방법

### Title of Invention

The cultivation of the hematopoietic stem cell through the co-cultivation with the adult stem cell and propagating method.

### 요약

본 발명은 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음 단층 배양하고, 상기 단층배양된 단핵세포구를 성체줄기세포 존재하에서 공동배양함을 특징으로 하는 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법에 관한 것이다.

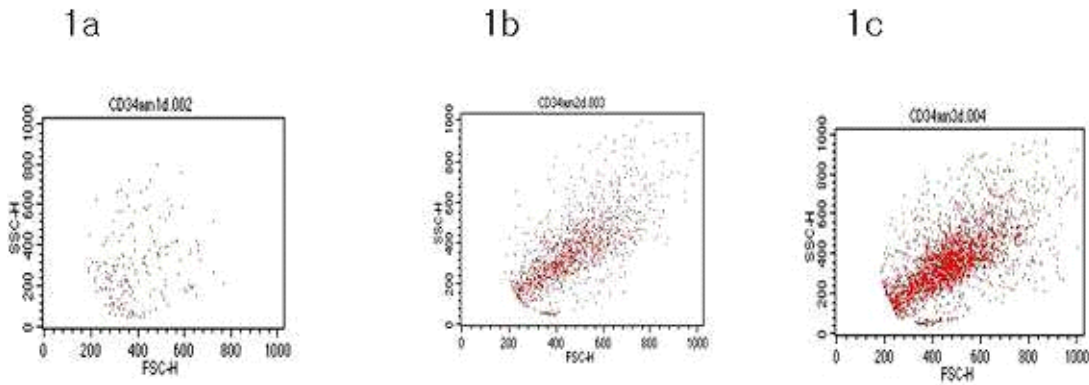
### Abstract

The invention relates to human peripheral blood more detailed as the cultivation of the human hematopoietic stem cell or the precursor cell and propagating method, the bone marrow, and the cultivation of the hematopoietic stem cell which cultivates single story after separating the monocyte outlet from any one or greater selected from the group comprised of the umbilical cord blood and is characterized to cultivate jointly the monocyte outlet cultivated in single layer as described above under the presence of the adult stem cell. Or the precursor cell and propagating method.

제대혈, 성체줄기세포, 조혈모세포, CD34 양성세포

The umbilical cord blood, the adult stem cell, the hematopoietic stem cell, the CD34 positive cell .

### 대표도면 (Representative drawing)



## 청구의 범위

### 청구 1항:

다음 단계를 포함하는 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법: (a) 냉동 보관 중인 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음, 단층 배양하는 단계; 및 (b) 상기 단층 배양된 단핵세포구를 인간 조직 유래 성체줄기세포 존재 하에 공동 배양하는 단계.

### 청구 2항:

제1항에 있어서, 상기 단핵세포구는 냉동 보관 중인 인간 제대혈 유래인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구 3항:

제1항에 있어서, 상기 인간 조직 유래 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택된 인간조직 유래 인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구 4항:

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 무혈정 또는 혈청배지에서 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

### 청구 5항:

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 성체줄기세포: 단핵세포구의 비율이 1-5:1인 것을 특징으로 하는 방법

### 청구 6항:

제1항에 있어서, 상기 공동배양은 1 내지 180시간 동안 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

### 청구 7항:

제6항에 있어서, 상기 공동배양은 24내지 168시간 동안 이루어

## Scope of Claims

### Claim 1:

The cultivation of the human hematopoietic stem cell or the precursor cell and propagating method including the following step: the step : (b) which cultivate single story it separates the monocyte outlet from any one or greater selected from group comprised of the human peripheral blood which is in (a) freeze preservation, and the bone marrow and umbilical cord blood and the step cultivating the monocyte outlet cultivated in single layer as described above with the human origin of organization adult stem cell presence \*\*\* cavity.

### Claim 2:

As for claim 1, the method called the human umbilical blood originated in which the monocyte outlet is in the freeze preservation.

### Claim 3:

As for claim 1, the method called the selected human tissue originated from group comprised of the human origin of organization adult stem cell is the bone marrow, umbilical cord blood, blood, soy sauce, skin, gastrointestinal tract, placenta and womb.

### Claim 4:

As for claim 1, the method wherein the co-cultivation is achieved in the bloodless gad or the serum medium.

### Claim 5:

As for claim 1, the co-cultivation is the adult stem cell: the method in which the rate of the monocyte outlet is 1-5:1.

### Claim 6:

As for claim 1, the method wherein the co-cultivation is made for 1 through 180 hours.

### Claim 7:

As for claim 6, the method wherein the co-cultivation

어짐을 특징으로 하는 방법.

is made for 24 through 168 hours.

**청구 8항:**

**Claim 8:**

제1항에 있어서, 상기 조혈모세포 또는 전구세포는 CD34+, Thy1.1+, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-의 면역학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

As for claim 1, method of showing the hematopoietic stem cell or the precursor cell is the immunological characteristic of the CD34+, thy1.1+, CD45+, KDR+, CD38- and lin-.

**배경기술**

**Background Art**

본 발명은 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는, 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음 단층 배양하고, 상기 단층배양된 단핵세포구를 성체줄기세포 존재하에서 공동배양함을 특징으로 하여 상기 조혈모세포 또는 전구세포의 증폭을 촉진시키는 배양 및 증식 방법에 관한 것이다.

The invention relates to human peripheral blood more detailed as the cultivation of the human hematopoietic stem cell or the precursor cell and propagating method, the bone marrow, and cultivation and the propagating method it cultivates single story after separating the monocyte outlet from any one or greater selected from the group comprised of the umbilical cord blood and it is characterized to cultivate jointly the monocyte outlet cultivated in single layer as described above under the presence of the adult stem cell and for accelerating the amplification of the hematopoietic stem cell or the precursor cell.

조혈모세포 (hematopoietic stem cell) 또는 전구세포 (progenitor cell) 는 제대혈에서 유래하며, 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 혈구세포로 분화될 수 있는 세포로서, 줄기세포의 특징인 자가복제능력, 다세포분열능, 다분화잠재능 등을 지니고 있다( van der Kooy D., science, 287, pp 1439-1441, 2000).

The self-renewing capacity called the characteristic of the stem cell it is the cell which can be specialized to the blood cell including the red blood cell, the leukocyte, the platelet etc. the hematopoietic stem cell (hematopoietic stem cell) or the precursor cell (progenitor cell) is derived from the umbilical cord blood, \*\*\*, the polydisperse potentia etc. are carried ( van der Kooy D., science, 287, pp 1439-1441, 2000).

현재 제대혈을 이용한 조혈모세포 또는 전구세포의 이식은 임상적으로 활성화되어 있고, 특히 고용량의 화학적요법 후의 암환자가 악성조혈상태일 때 만약 자기 조직의 세포가 적합하지 않고 성인의 공여자가 없을 때 조혈모세포 또는 전구세포는 이식의 중요한 공급원으로서 인정되며, 여러 가지 질병들이 조혈모세포 또는 전구세포 이식을 통하여 치료되어 지고 있다. 그 예로서 급만성 백혈병, 재생불량성 빈혈, 골수이형성 증후군, 다발성 고수종, 악성 림프종 등 주로 혈액암 관련 질환에서 완치를 위한 치료로 시도되어져 왔고 최근에는 유방암, 난소암, 신장암, 소세포성폐암등 고형암과 불응성 전신성 홍반성 낭창, 불응성 류마티스 관절염 등 악성 자가 면역질환에도 좋은 치료 성적을 거두고 있다(Lennard, et al, BMJ, 321, pp 433-437, 200; Ikehare, Experimental Hematology, 29, pp661-669, 2001).

Presently, the transplant of the hematopoietic stem cell or precursor cell using umbilical cord blood is clinically activated. It chemicals of especially, the high-capacity when the cancer patient after the therapy is the malignancies hematopoiesis state the cell of the self-organizing is not suitable and when there is no donor of adult the hematopoietic stem cell or the precursor cell is recognized as the important supply source of the transplant. And various diseases are cured through the hematopoietic stem cell or the precursor cell transplant. For example, in the blood cancer related disease was mainly attempted as the treatment for the perfect cure with class chronic leukemia, aplastic anemia, myelodysplastic syndrome, multiple coriander kind, the malignant lymphoma etc and recently the good treatment record is collected in the malignancies autoimmune disease including the breast cancer, ovarian cancer, kidney cancer, the solid cancer including the small-cell lung cancer etc and refractoriness systemic lupus erythematosus, the refractoriness rheumatoid arthritis etc (Lennard, et al, BMJ, 321, pp 433-437, 200; Ikehare, Experimental Hematology, 29, pp661-669, 2001).

그러나 이러한 조혈모세포 또는 전구세포는 탯줄의 제대혈로부터 적은 양의 혈액만을 수집할 수밖에 없으므로, 결과적으로 적은수의 세포만을 얻는다는 단점이 있다. 조혈모세포 또는 전구세포의 증폭이 안 된 상태에서의 이식은 대개 아동 환자들에게 한정된다. 그리하여 지난 십년 동안, 골수에서 뿐만 아니라 제대혈에서의 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 시험관내 증폭에 대한 관심이 증가 되고 있다 ( Cairo M. S., et al., Blood, 90, pp 4665-4678, 1997; Mayani H., et al., Stem cells,

But such hematopoietic stem cell or the precursor cell cannot help collecting from the umbilical cord blood of the umbilical cord only the small amounts of blood. Therefore it has the disadvantage consequently that it obtains only the cell of the few number. The transplant at the state where and the amplification of the hematopoietic stem cell or the precursor cell will not be achieved is usually restricted to prepubertal patients. The con

16, pp153-165, 1998). 또한 최근 보고에서 냉동 보관되어 있던 제대혈의 경우 해동시켜 조혈모세포의 활성을 살펴보았을 때 그들의 생리적 생존율이 상당히 낮음을 보고한 바가 있다 ( Shim J S., et al., Br J Haematol., 135, pp210-213, 2006)

따라서 조혈모세포 또는 전구세포의 이식을 위해서는 우리가 필요로 하는 조혈모세포 또는 전구세포를 대량으로 얻는 기술의 개발이 매우 유용하다. 따라서 이러한 조혈모세포 또는 전구세포를 대량으로 증폭하여 수득하기 위하여, 여러 가지 방법 및 최적의 배양조건의 개발이 시도되어져 왔다.

현재까지 알려진 대표적인 배양방법으로, 체외에서 여러 가지 재조합 자극성 사이토카인(recombinant stimulatory cytokine)을 배지에 첨가하여 배양하는 방법들이 있었다( Metcalf D., et al., Biomed Pharmacother, 55, pp 75-78, 2001; Ian McNiee, et al., Experimental Hematology, 29,pp3-11, 2001). 어떤 연구에서는 조혈 저해자(hematopoietic inhibitor)에 대한 항체를 사용했고, 다른 연구에서는 다른 기질 세포주를 조혈세포의 배양에 이용하였다( Yamaguchi M., et al., Exp. Hematol., 29, pp 174-182, 2001).

조혈모세포 또는 전구세포 배양시 사용되는 사이토카인은 임상적으로 이식 시 여러 가지 문제점을 나타내고, 그 부작용으로 인하여 감염의 위험성이나 종양발생에 대한 우려가 있다. 가령 IL-2의 사용은 심한 저혈압 증세 유발과 모세혈관 유출 증후군 등과 같은 심각한 부작용을 발생시키므로 그 사용이 제한 받고 있다. 모세혈관 유출 증후군은 조직의 모세혈관으로부터 흘러나온 조직액이 축적되는 현상이다( Rosenstein M., et al., J. Immunol., 137, pp1735-1742, 1986).

## 발명의 내용

### 발명의 효과

상기에서 살핀 바와 같이, 본 발명의 세포 배양 및 증식 방법은 제대혈로부터 CD34+ 조혈모세포 또는 전구세포를 분리하지 않고 단핵세포구의 상태로 성체줄기세포와 무혈청 또는 혈청배지에서 공동 배양하는 것으로, 이는 단시간에 경제적으로 CD34+/CD38- 조혈모세포를 증식 시키는 것으로, 그리고 이식에 안전한 조혈모세포 또는 전구세포의 증식을 가증시키는 효과를 나타낸다. 특히, 조혈모세포의 이러한 높은 증식율때문에, 통상적으로 냉동 보관하고 있는 제대혈을 이용하여도 대량의 조혈모세포 및 전구세포를 수득할 수 있다. 따라서, 임상적으로 조혈모세포 또는 전구세포의 이식을 필요로하는 혈액암

cern about in vitro amplification of the human hematopoietic stem cell at the umbilical cord blood or the precursor cell is and increased for the deca- year passing by the bone marrow ( Cairo M. S., et al., Blood, 90, pp 4665-4678, 1997; Mayani H., et al., Stem cells, 16, pp153-165, 1998). Moreover, recently, when thawing in case of the umbilical cord blood refrigerated and stored in the report and looking into the activity of the hematopoietic stem cell because the physiological survival rate of it considerably reports the lowness the lowness has ( Shim J S., et al., Br J Haematol., 135, pp210-213, 2006)

Therefore, for the transplant of the hematopoietic stem cell or the precursor cell, the development of the hematopoietic stem cell which the cage need or the technology which massively obtains the precursor cell is very useful. Therefore, in order that the hematopoietic stem cell or such precursor cell was massively amplified and it obtained many methods and optimal culture tub proposal development were attempted.

There can be the methods which adds various recombining irritant cytokine (recombinant stimulatory cytokine) in the culture medium and cultivated in vitro as the till now known and representative culture method ( Metcalf D., et al., Biomed Pharmacother, 55, pp 75-78, 2001; Ian McNiee, et al., Experimental Hematology, 29,pp3-11, 2001). The antibody to the hematopoiesis inhibitor (hematopoietic inhibitor) in any kind of research was used. The other stromal cell line was used for the cultivation of the hemopoietic cell of the other research ( Yamaguchi M., et al., Exp. Hematol., 29, pp 174-182, 2001).

The cytokine used during the hematopoietic stem cell or the precursor cell cultivation represents clinically, many problems in the transplant. And it has the concern about the risk of the infection or the oncogenesis due to the side effect. For example,, since causing the side effect which the use of the IL-2 does about three angles including the severe hypotension symptoms induction and capillary vessel outflow syndrome etc. the use takes the limit. The capillary vessel outflow syndrome may be the phenomenon that the press juice flowing out from the capillary vessel of the organization is accumulated ( Rosenstein M., et al., J. Immunol., 137, pp1735-1742, 1986).

## Summary of Invention

### Effects of the Invention

In the above case, the cell culture and the propagating method of the present invention it inspects closely show the effect that the CD 34 + hematopoietic stem cell or the precursor cell is not separated from the umbilical cord blood and it cultivates jointly to the state of the monocyte outlet in the adult stem cell and serum-free or the serum medium. In a short time this economically multiplies the CD 34 + / CD 38 - hematopoietic stem cell. The proliferation of the safe hematopoietic stem cell or the precursor cell is

등의 질환을 가진 환자의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

increased in and, the transplant. Particularly, the hematopoietic stem cell and precursor cell of bulk can be obtained due to the high breeding ratio of the hematopoietic stem cell using the umbilical cord blood which it generally freezes and stores. Therefore, it can be usefully used for the treatment of the patient having the disease including the blood cancer etc. clinically requires the transplant of the hematopoietic stem cell or the precursor cell.

## 기술적 과제

이러한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자는 증식을 위한 배양 이전에 CD34+ 조혈모세포 또는 전구세포를 분리하지 않고, 또한 사이토카인이나 혈청 등 인위적인 호르몬을 사용하지 않고, 성체줄기세포와 공동 배양함으로써 단기간에 효과적으로 증폭시키고, 이식과정에서의 정착을 위한 미세환경을 제공하는 새로운 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 주된 목적은 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 수득한 단핵세포구와 성체줄기세포와 공동 배양하여 조혈모세포 또는 전구세포의 수를 증폭시키는 배양 및 증식 방법을 제공하는데 있다.

## Technical Task

In order to solve this problem, the inventor previously did not separate the CD 34 + hematopoietic stem cell or the precursor cell with the cultivation for proliferation. The artificial with moreover, the cytokine or the blood serum etc. hormone was not used. It effectively amplified in the short-term by cultivating jointly with the adult stem cell. The invention was completed by developing the cultivation of the new hematopoietic stem cell providing the microenvironment for the settlement at the implant process or the precursor cell and propagating method.

The purpose of being principal of the present invention provides cultivation and the propagating method for amplifying the number of monocyte outlet obtained in selected any one or greater and hematopoietic stem cell or the precursor cell cultivate jointly with the adult stem cells from group comprised of the human peripheral blood, and the bone marrow and umbilical cord blood.

## 발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상에서 단핵세포구를 분리한 다음, 단층 배양하는 단계; 및 (b) 상기 단층 배양된 단핵세포구를 인간 조직 유래 성체줄기세포 존재 하에공동 배양하는 단계 포함하는 인간 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법을 제공한다.

특히, 상기 단핵세포구는 냉동 보관 중인 인간 제대혈 유래이고, 상기 인간 조직 유래 성체줄기세포는 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또한, 상기 방법에 따른 조혈모세포 또는 전구세포는 CD34+, Thy1.1+, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-의 면역학적 특성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

### 용어의 정의

본 발명에서 사용된 용어 #39#조혈모세포#39#는 적혈구 #183#백혈구#183#혈소판을 만드는 미분화된 골수조혈세포의 조상세포를 지칭한다. 정상인의 골수혈액에는 모든 혈액세포

## Structure & Operation of the Invention

The above, to accomplish the above objects. And the invention provides (a) human peripheral blood, the bone marrow, and the cultivation of the human hematopoietic stem cell cultivating the step cultivated single story and the monocyte outlet cultivated in single layer (b) the above with the human origin of organization adult stem cell presence \*\*\* cavity it separates the monocyte outlet from any one or greater selected from the group comprised of the umbilical cord blood containing step or the precursor cell and propagating method.

Particularly, it is selected from group comprised of the human origin of organization adult stem cell is the bone marrow, umbilical cord blood, blood, soy sauce, skin, gastrointestinal tract, placenta and womb it is the human umbilical blood originated in which the monocyte outlet is in the freeze preservation. Moreover, the hematopoietic stem cell according to the method or the precursor cell exhibits the immunological characteristic of the lin- and the increased CD34+, the Thy1.1+, the CD45+, the KDR+, the CD38-.

Hereinafter, the invention is particularly explained.

The definition of the term.

In the present invention, it is discovered in body to the meaning called the mother cell which the cell (CD34 positive cell) with the capability which names the algaoid c

포를 만들어낼 수 있는 능력을 지닌 세포(CD34 양성 세포)가 약 1% 존재하는데 이를 조혈모세포라고 한다. 피를 만드는 어머니세포라는 뜻으로 온 몸에서 발견되지만 특히 골수에서 대량으로 생산된다. 이 세포로부터 피를 구성하는 세포에 해당하는 적혈구#183#백혈구#183#혈소판이 분화되어 만들어진다. 아울러 똑같은 자신을 만들어낼 수 있는 자가복제 기능도 가지고 있으며, 골수의 총조혈모세포 중 0.05~0.25% 정도를 차지한다. 말초혈액 조혈모세포는 골수에서 유래하며 혈류를 순환하는 조혈모세포로서 자가복제 및 성숙된 세포로 분화하는 성질을 가지고 있다.

본 발명에서 사용된 용어 #39#전구세포#39#는 특정 유형의 세포로 분화되거나 특정 유형의 조직을 형성하도록 된 세포를 지칭한다.

본 발명에서 사용된 용어 #39#줄기세포#39#는 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 마스터 세포를 지칭한다. 줄기세포는 발달가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래(#39#전이(transit)#39#) 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#성체 줄기세포#34#란 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체 단계에서 나타나는 줄기세포를 의미하며, 그 분화능이 일반적으로 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정된다

본 발명의 성체 줄기세포는 이미 공지되어 있는 유방, 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁 등으로 구성된 군에서 유래된 성체 줄기세포로부터 분리, 사용할 수 있다.

성체 줄기세포는 성체세포로 분화할 수 있는 신경줄기세포, 골수세포로 분화할 수 있는 조혈모 세포, 뼈, 연골, 지방, 근육 등으로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포, 간세포로 분화할 수 있는 간줄기세포 등이 있다. 그 중에서도 중간엽 줄기세포는 골세포뿐만 아니라 연골세포, 지방세포, 근육세포, 성유세포 등 여러 가지 근골격계 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있는 세포이다.

중간엽 줄기세포는 제대혈(탯줄)과 골수 등에 존재하므로 세포 분리도 다른 성체조직보다 용이하며 중간엽 줄기세포를 이러한 근골격계 질환뿐 아니라 다른 질환의 치료에 이용하고자 하는 노력들이 행하여지고 있다. 그 이유는 다른 줄기세포와는 달리 골수에서 쉽게 배양 증폭되며, 기존에 알려져 왔던 바와는 달리 중간엽 유래 세포뿐만 아니라, 내배엽 혹은 외배엽 유래의 세포

ells of the divided myelopoiesis cell in which the used term ' hematopoietic stem cell ' makes the red blood cell · leukocyte · platelet is able to make all blood cells in the bone marrow blood of the normal person exists with about 1% but it does this as the hematopoietic stem cell makes blood but In especially, the bone marrow is massively produced. The red blood cell · leukocyte · platelet corresponding to the cell organizing blood from this cell is specialized and it is made. And the self-replication function of making the same oneself has. And about 0.05~0.25% is occupied among the total hematopoietic stem cell of the bone marrow. The peripheral blood hematopoietic stem cell has the property specializing in the self-replication and the mature cell as the hematopoietic stem cell which circulates the blood flow while being derived from the bone marrow.

In the present invention, the cell forming the organization of the special type the used term ' precursor cell ' is specialized to the cell of the special type is named.

In the present invention, the master cell which it unlimitedly can reproduce is named so that the used term ' stem cell ' form the specialized cell of the boiler and organization. The stem cell may be versatility or the pluripotent cell which development is possible. The stem cell can be divided into the daughter stem cell of 2 or one daughter stem cell and one originated (the ' transition ') cell. And thereafter it is mature of the organization and it is proliferated to the complete cell of the form.

In the present invention, 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 is meant. And the stem cell is restricted to the cell in which generally the blastogenesis organizes the specific tissue

It can use from the adult stem cell in which the adult stem cell of the present invention originates in group comprised of the breast, bone marrow, umbilical cord blood, blood, soy sauce, skin, gastrointestinal tract, placenta and womb etc. the already is known to have after dividing.

The adult stem cell is the nature reproductive cell may be the neural stem cell, specializing the mesenchyme stem cell, specializing in the hematopoietic stem cell, bone, the cartilage, the fat, the muscle etc specializing in the bone marrow cell the liver stem cell etc. can specialize in the interstitial cell. Among them, the capability in which the mesenchyme stem cell can specialize in not only the bone cell but also the cartilage cell, the fat cell, the muscular cell, various musculoskeletal cells including the fibrous cell etc may be referred to the cell having.

Efforts of being facilitated than the other adult tissue and the cell sorting using the mesenchyme stem cell for the treatment of not only such musculoskeletal disorders but also the other disease since the mesenchyme stem cell exists in the umbilical cord blood and bone marrow etc. are performed. The cell of the endoderm not o

로 분화가 가능하며, 자가의 세포를 이용하므로 면역에 의한 거부 반응이 없으며, 배아줄기세포와 달리 원하는 방향으로 분화되지 않은 세포가 암을 유발할 가능성이 매우 희박하여 임상적으로 매우 중요한 장점을 갖고 있기 때문이다.

특히, 본 발명의 일 구체예로서, 윤리학적 문제가 없고 줄기세포를 얻기 용이하며 다분화능을 가진 제대혈에서 유래한 줄기세포를 사용할 수 있다.

제대혈은 최근에 많은 양의 줄기세포를 가지고 있는 것으로 알려지면서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 제대혈이 조혈모세포의 풍부한 원천으로 알려진 이후, 임상적으로 제대혈 이식을 통해 혈액관련 질환을 치료하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있으며, 자가이식 치료를 위하여 제대혈을 냉동시켜 수년 후 사용가능한 상태로 보존하는 제대혈 은행이 국내에서도 활성화되고 있다. 제대혈은 골수와는 달리 분만과정에서 버려지는 제대(umbilical cord)에서 간단한 기술을 통해 얻을 수 있으며, 그 양에 비해 수많은 조혈모세포 및 줄기세포를 포함하고 있다. 또한, 제대혈 이식시 나타날 수 있는 이식편대숙주반응이 골수 이식에 비해 상당히 적어 제대혈에 포함되어 있는 줄기세포의 성상 확인 및 그의 임상예의 응용 확대를 위한 연구가 전 세계적으로 이루어지고 있다. 또한, 제대혈에 중간엽(간엽) 줄기세포의 존재(Ericas A, et al., Br. J. Haematol. 109: 235-242, 2000; Lee OK, et al., Blood 103: 1669-1675, 2004)가 보고되고 있다.

본 발명에서 사용하는 용어 #39#배양#39#이라는 용어는 생물체(주로 미생물 및 발생중인 동식물의 배)나 생물체의 일부(기관 #183#조직 #183#세포 등)를 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 일을 의미한다. 이 경우 외적 조건으로 온도 #183#습도 #183#빛 #183#기체상의 조성(이산화탄소나 산소의 분압) 등이 중요하며, 그 밖에 배양되는 생물체에 가장 중요한 직접적인 영향을 주는 것은 배지(培地)이다. 배지는 배양기라고도 하며, 그 생물체의 직접적인 환경인 동시에 생존이나 증식에 필요한 각종 영양소의 공급장이다. 배지가 액체인 경우를 액체배지라 하고, 액체배지에 한천 #183#젤라틴을 가한 것을 고형배지라고 한다. 배양하는 생물체의 종류에 따라 각종 영양물질이나 삼투압 #183#pH 등을 달리하는, 인공적으로 각종 성분을 조합시켜서 만든 배지를 합성배지(合成培地:synthetic medium)라고 한다.

nly not only the lobus medius cellular origin, or the ectoderm originated the differentiation reason for the was easy to the other stem cell in the bone marrow it was increased with cultivation and had been being known in the existing are made possible. And there is no rejection by the immunity since using the cell of the self. And the possibility that the cell which is not specialized to the desired direction causes the cancer to the embryonic stem cell is very slim and it clinically very has the basic advantage.

Particularly, as one embodiment of the present invention, the stem cell derived from umbilical cord blood having the multipotent it is facilitated to there be no ethics problem and obtain the stem cell can be used.

While the amount is known that it has with the stem cell in which recently the umbilical cord blood is many of the amount the research is actively accomplished. The umbilical cord blood is known as the abundant source of the hematopoietic stem cell. Since then cities and provinces to clinically cure the blood related disease through the umbilical cord blood transplant are very much made. And the umbilical cord blood is refrigerated for the autotransplantation treatment and the umbilical cord blood bank preserved at the usable state is activated after the several years in national. The umbilical cord blood comprises the hematopoietic stem cell which can obtain from the umbilical cord which is thrown away in the childbirth process to the bone marrow through the simple procedure and is endless in comparison with the amount and the stem cell. Moreover, it is considerably less in comparison with the transplantation of the marrow and the research for the application enlargement of detection and characterization of the stem cell included in the umbilical cord blood and its clinic world the graft-versus-host reaction showing up in the umbilical cord blood transplant is made. Moreover, the presence (Ericas A, et al., Br. J. Haematol. 109: 235-242, 2000; Lee OK, et al., Blood 103: 1669-1675, 2004) of the lobus medius (the mesenchyma) stem cell is reported to the umbilical cord blood.

In the present invention, the key in the rearing means the task in the environment condition in which the term called the term 'cultivation' this used befittingly artificially controls the part (the boiler · organization · cell etc) of living body (the ship of animal and plant mainly generated with the microorganism) or the living body. In this case, the living body, which is besides that cultivated the composition (the partial pressure of the carbon dioxide or oxygen) of the temperature · humidity · light · gas phase etc. is important to the external condition most, the important direct influence may be referred to the culture medium it gives. The culture medium may be the source of supply of the direct environment of the living body all kinds of the nutrients necessary for the alive or proliferation it is called the culture medium. It says to be in that case in which the culture medium is liquid the liquid culture medium. It is called the solid medium to add the agar · gelatin to the liquid culture medium. According to the kind of the living body cultivated, the culture medium which combines artificially, all kinds of the components and which differentiates all kinds of the nutrimenteses or the osmotic pressure · pH etc. mad

e is decided on as the synthetic medium (合成培地:synthetic medium).

본 발명에서 사용하는 #34#증식(proliferation)#34#이라는 용어는 세포가 분열되어 동질의 것이 불어나는 것으로서 보통 다세포생물의 체내에서 세포수가 증가되어 가는 것을 말한다. 세포수가 증식되어 어느 시기에 이르면, 형질이 변화(분화)되어 가는 것과 동시에 제어되고 있는 것이 보통이다. 체내에서 세포가 증가되어 가는 것과, 또 세포 내에서 세포질이 신생(新生)되어 가는 경우에는 생장으로 구별하는 경우가 많다. 그러나 생물학적으로 세포수가 증가된다는 점에서 보면, 다세포생물의 발생기에서 분화가 일어나지 않는 시기는 증식으로 보는 것이 정당하다

In the present invention, it refers to that the cell the term called the " proliferation " this used is divided and of the homogeneous grows larger and the cell number is usually increased of the multicellular creature in vivo. If the cell number is proliferated and it reaches a time it is common that it becomes the character with the change (differentiation) it at the same time is controlled. In vivo, in case the cytoplasm is in the cell new the cell is increased there is much case of distinguishing into the outgrowth. But if it looks at in that the cell number is biologically increased it is justifiable that the time when the eruption does not occur in the generator of the multicellular creature looks at with proliferation

본 발명의 인간 조혈모세포 또는 전구세포는 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상에서 유래될 수 있고, 이하에서는 그 중에서 특히 제대혈 유래 조혈모세포 또는 전구세포를 중심으로 기술한다.

It can originate in one or greater selected from the human hematopoietic stem cell of the present invention or group comprised of the precursor cell is the human peripheral blood, and the bone marrow and umbilical cord blood. Hereinafter it among them describes around especially, the umbilical cord blood originated hematopoietic stem cell or the precursor cell.

본 발명의 조혈모세포 또는 전구세포 배양 및 증식 방법은 냉동 보관된 제대혈을 해동하여 수득한 단핵구를 단층 배양하는 제 1단계: 태반을 비롯한 인체 조직 유래의 성체줄기세포를 분리 배양하는 제 2단계: 및 제 1단계에서 배양된 세포와 성체줄기세포와 공동 배양하여 조혈모세포 또는 전구세포의 배양 및 증식 방법을 포함함을 그 특징으로 한다. 본 발명의 전과정은 무균적 환경에서 이루어지는 것이 바람직하다.

The hematopoietic stem cell of the present invention or 1th step of cultivating single story the monocyte which thaws and obtained: 2nd step of cultivating after dividing the adult stem cell from the human tissue originated including the placenta: it is characterized that it cultivates jointly with the cell and the adult stem cell cultivated in the first step and the cultivation of the hematopoietic stem cell or the precursor cell and propagating method is included. The entire steps of the present invention may be the be desirable it is achieved in the aseptic environment.

### 1. 제대혈 유래 단핵세포구의 수득

### 1. Umbilical cord blood originated monocyte old friendship acquisition .

본 발명에서, 조혈모세포 또는 전구세포는 혈액을 구성하는 세포로 적혈구, 백혈구, 혈소판을 만드는 조혈세포를 말한다. 이 조혈모세포 또는 혈구세포는 혈액질환이나 면역질환, 암들을 치료하는데 중요한 역할을 하며, 이러한 조혈모세포 또는 전구세포는 골수, 말초혈액, 제대혈 등으로부터 분리 가능하다.

In the present invention, the clause cell making the red blood cell, the leukocyte, and the platelet with the cell in which the hematopoietic stem cell or the precursor cell organizes blood is referred to. The blood disease or the immune disease, and cancers are cured by this hematopoietic stem cell or the blood cell but the important role is. And this hematopoietic stem cell or the precursor cell is seperable from the bone marrow, the peripheral blood, the umbilical cord blood etc.

본 발명에서 일 태양으로 사용하는 제대혈은 인간을 포함한 포유동물에서 태반과 태아를 연결하는 제대정맥으로부터 채취된 혈액으로 정의되며, 본 발명의 조혈모세포 또는 전구세포 배양 및 증식 방법에서는 인간의 제대혈을 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 본 발명의 구체예로 냉동 보관 되어 있던 인간 제대혈을 해동하여 그로부터 단핵세포구(peripheral mononuclear lymphocyte)를 수득한다.

In the present invention, the umbilical cord blood used as one aspect is human may be referred to the be desirable to use the umbilical cord blood of the human in the hematopoietic stem cell of the present invention or the precursor cell cultivation and propagating method it is defined as the blood collected from the umbilical vein for connecting the placenta in the mammal included and the fetus. Particularly, the human umbilical cord kept to the embodiment of the present invention with freezing is thawed and the monocyte globe (peripheral mononuclear lymphocyte) is obtained by the since then.

제대혈은 분만 후 태반이 박리되기 전에 채취, 냉동 보관하며, 제대혈로부터 단핵세포를 분리하기 위해서는 피콜-하이팩 밀

The umbilical cord blood may be formed of picking, and the publicly known method like the Ficol-Hypaque densi

도구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method) 과 같은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

구체적으로, 냉동보관 되어 있던 제대혈을 해동하여 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS)과 혼합하여 희석한 후, 희석된 제대혈과 동량의 피콜-하이팩 용액(Ficoll-Hypaque, 밀도; 1.077 g/ml)에 중첩시킨다. 이때, 피콜-하이팩 용액은 사용 전에 실온이 되도록 하며, 희석된 제대혈의 부피가 피콜-하이팩 용액 부피의 3배가 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 이를 원심분리하여 적혈구층, 단핵세포층 및 혈청층을 분리한다. 파스퇴르 피펫(pasteur pipette) 등을 이용하여 단핵세포층만을 새로운 튜브로 옮기고, PBS 등으로 세척하여 단핵세포층 채취시 혼입된 피콜-하이팩 용액이나 오염된 혈소판을 제거한다. 이와 같이 분리된 단핵세포는 다분화능 전구/줄기세포의 분리 및 배양에 바로 이용하거나 초저온 냉동시켜 장기간 보관 후 사용할 수 있다.

## 2. 인체조직 유래 성체줄기세포의 분리 및 배양

본 발명의 성체 줄기세포는 이미 공지되어 있는 유방, 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁 등의 인간 조직에서 유래된 성체 줄기세포로부터 분리, 사용할 수 있다.

특히, 본 발명에 일 태양으로 사용하는 인간 태반조직 유래 줄기세포는 성인의 자가성 성체줄기세포로 분류되고, 태반조직을 사용하므로 윤리적으로 문제가 되지 않는다.

태반(placenta)은 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 것으로 무게 500g, 지름 15~20cm, 두께 2~3cm 정도의 원반 형태로 되어있다. 태반의 한쪽은 모체와 닿아 있고 다른 한쪽은 태아와 맞닿아 있으며 그 사이 공간에 모체의 혈액이 담겨 있어 태아에게 영양분을 공급하게 된다. 태반은 양막, 장막, 탈락막의 3층으로 구성되어 있다. 또한, 양막은 태아를 둘러싸고 있는 얇고 투명한 막으로, 양수가 들어 있으며, 양막에는 태아의 줄기세포가 존재한다. 탈락막은 수정란이 자궁에 착상되기 위해 자궁의 상피세포가 변형되어 형성된 막으로써 모체의 줄기세포가 존재한다. 태반에 들어있는 줄기세포의 양은 아주 풍부하며 증식이 잘되고 다른세포로 분화도 가능하다.

통상 다음과 같은 방법을 통하여, 인간을 포함한 포유동물

ty gradient separation (Ficoll-Hypaque density gradient method) the monocyte is separated from the umbilical cord blood it freezes and stores the placenta is exfoliated after the childbirth.

Specifically, the umbilical cord blood which becomes with the freeze preservation is thawed and it mixes with the phosphate buffer solution (phosphate buffered saline, PBS) and it superposes at Ficol-Hypaque solution (the Ficoll-Hypaque, and the density : 1.077 g / ml) of the equivalent and the diluted umbilical cord blood after doing the dilute. At this time, the Ficol-Hypaque solution may be the desirable the treble of the Ficol-Hypaque solution volume does not exceed the volume of the diluted umbilical cord blood it does in order to be lost temperature before the use. This is centrifuged and the red blood cell layer, and the mononuclear cell layer and blood serum layer are separated. It moves to the new tube using the Pasteur pipette etc. only the mononuclear cell layer. It washes to PBS etc. and the mixed Ficol-Hypaque solution or the polluted platelet is removed in the mononuclear cell layer picking. In this way, the separated monocyte immediately uses for the separation and cultivation of the multipotent bulb / stem cell or it refrigerates to the super low temperature and it can use after the long-term preservation.

## 2. The separation and cultivation of the human tissue originated adult stem cell .

The adult stem cell of the present invention can use from adult stem cell derived from the human tissue including the breast, bone marrow, umbilical cord blood, blood, soy sauce, skin, gastrointestinal tract, placenta and womb etc. the already is known to have after dividing.

Particularly, the human placenta origin of organization stem cell used in the invention as one aspect is classified as the autologous adult stem cell of adult. The autologous adult stem cell does not become a problem since using the placenta tissue.

The placenta is made among the pregnancy for the fetus and it consists of the weight 500g, the diameter 15~20cm, and the discotic of about thickness 2~3cm. Supplies the nutrient to the fetus the blood of the parent includes to space one side of the placenta contacts of the parent and the other group contacts with each other with the fetus. The placenta comprises the amnion, curtain, and 3 layer of the decidua. Moreover, the positive number gives about the thin and transparent film in which the amnion surrounds the fetus. And the stem cell of the fetus exists in the amnion. The stem cell of the parent exists as the film in which the epithelial cell of the womb turns so that the fertilized egg be conceived an idea in the womb and the decidua is formed. Amount of the stem cell which is in the placenta is quite abundant and proliferation goes well and the differentiation is possible with another cell.

Generally, the versatility adult stem cell is refined

의 태반을 비롯한 인체조직으로부터 다능성 성체줄기세포를 분리 및 정제하여, 1차 배양함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 바람직한 양태에서, 성체줄기세포는 공지의 세포배양 배지, 즉 DMEM,  $\alpha$ -MEM, McCoy5A, Eagle#39#s basal, CMRL, IMDM 배지 등 일반적으로 사용되는 세포배양용 배지 중 선택된 하나에, 인슐린, 트랜스페린, 셀레니움, 우혈청알부민, 리놀렌산 등을 첨가하여 사용하며, 특히 바람직하게는 DMEM 배지를 사용한다. 즉, 본 발명의 일 구체예로 성체줄기세포인 태반조직 중간엽 줄기세포의 1차 배양의 경우 FBS, FGF 가 포함된 DMEM 배지에서 배양하고, 상피모세포의 경우는 위와 동일한 배지를 사용하되 인슐린과 FGF 대신 EGF를, 포함된 배지를 사용하여 배양할 수 있다.

인간 태반 조직샘플을 분리하여 각각 PBS로 세척한다. 세척된 태반 조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 (1mg/ml) 을 첨가한 DMEM (Dulbecco#39#s Modified Eagle Medium, Gibco) 배지를 이용해 37℃에서 1시간 동안 화학적 분해 작업을 한다. 화학적 분해된 조직들을 100 $\mu$ m 메쉬(mesh)에 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거후 1200rpm에서 1~10분간 원심분리하였다. 상층액은 석션(suction)하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1200rpm으로 1~10분간 원심분리하였다. 바닥에 있는 펠렛을 단일세포로 잘 부유시킨 후 bFGF가 함유되어 있는 DMEM 배지에서 1차 배양한다. 이들이 지난 후 디쉬 바닥에 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 배지를 2~3일마다 교체하면서 배양하여 인간 태반에서 분리한 성체 줄기 세포액을 수득하였다.

3. 제1단계에서 배양된 단핵세포구와, 제2단계에서 수득한 성체줄기세포의 공동 배양

본 발명의 세포배양 및 증식 방법에서 제대혈 유래 단핵세포구 (CD34+, Thy 1.1 +, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin- 세포군)와 성체줄기세포와의 공동 배양은, 상기에서 준비된 성체줄기세포에 제대혈 유래 단핵세포 (CD34+, Thy 1.1 +, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin- 세포)를 접종하여 공동배양하는 것을 특징으로 한다.

바람직하게는 성체줄기세포: 단핵세포(예를 들어, CD34+ 세포)의 비율이 1-5:1에 해당한다.

또한, 상기 배양 및 증식 방법에서, 공동배양은 1 내지 180 시간 동안, 바람직하게는 12 내지 168 시간 동안, 보다 바람직하게는 24 내지 168 시간 동안 이루어지는 것이 바람직하다.

through the method as follows from the human tissue including the placenta of the mammal including human with the separation. It cultivates with the first it can obtain. The adult stem cell in the aspect, done with the desirable of the present invention may be formed of the DMEM medium the insulin, the transferrin, selenium, the bovine serum albumin, the linolenic acid etc is added in one selected from the culture medium for the cell culture which is generally used the publicly known cell culture medium, in other words, the DMEM,  $\alpha$ -MEM, the McCoy5A, the Eagle's basal, CMRL, the IMDM culture medium etc. That is, in the DMEM medium containing FBS in case of the culture, and FGF of one embodiment of the present invention the placenta tissue mesenchyme stem cell called the adult stem cell, the culture medium such as the upper part in case of the epithelium hair cell it cultivates is used and EGF can be instead of cultivated using the included culture medium with insulin and FGF.

The human placenta tissue sample is separated and it washes to the respective PBS. Using the DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) culture medium with the collagenase (1mg/ml) the washed placenta tissue is small pieces cut, it works in 37℃ for 1 hour with chemical decomposition. The organization filtering the chemical disassembled organizations in 100 $\mu$ m mesh and was not disassembled 1~10 discrimination was centrifuged in 1200rpm after the removal. The pellet in which the supernatant remained in the suction and bottom surface centrifuged 1~10 discrimination at 1200rpm to PBS after doing washing. After floating the pellet which is in the bottom surface in the well at single cells it cultivates in the DMEM medium in which the bFGF is contained with the first. After two days was over cells which were not fixed on the dish bottom surface washed to PBS. While replacing the culture medium at 2~3 it cultivated and the adult stem cell liquid separated from the human placenta was obtained.

3. The co-cultivation of the adult stem cell obtained in the monocyte stomodaeum cultivated in the first step, and the second step.

In cell culture and propagating method of the present invention, the co-cultivation inoculate with umbilical cord blood originated monocyte (the CD 34 +, thy 1.1 +, CD 45 +, KDR +, CD 38 - and lin - cell) in the prepared adult stem cell and the co-cultivation between umbilical cord blood originated monocyte globe (the CD 34 +, thy 1.1 +, CD 45 +, KDR +, CD 38 - and lin - cell aggregates) and the adult stem cell cultivate jointly.

Preferably, adult stem cell: the rate of the monocyte (for example, the CD 34 + cell) corresponds to 1-5:1.

Moreover, the co-cultivation in cultivation and propagating method may be 1 through the be desirable preferably, more preferably, it is made for 180 hours for 12 through 168 hours for 24 through 16

8 hours.

또한, 사용하는 배지로서, 무혈청 또는 혈청 배지를 사용할 수 있고, 바람직하게는 무혈청 배지에서 수행함이 바람직하다.

Moreover, the serum-free or the serum medium it is the culture medium used may be referred to the be desirable preferably it performs in the invitroge n medium it can use.

본 발명에서 사용하는 세포배양배지는 상기 성분외에도 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 추가로 함유할 수 있다. 예를 들면, 말, 소 또는 사람의 혈청, 미생물의 오염을 막기 위해 페니실린, 스트렙토마이신 설페이트, 암포테리신 B, 젠타마이신, 또는 니스타틴 등의 항생제 및 항진균제등을 추가할 수 있다.

In the present invention, the cell culture medium used additionally can contain the assistant ingredient more than one besides the component as necessary. For example, the penicillin, streptomycin sulfate, AMPH, gentamycin or the nystatin, including, the antibiotic and antifungus agent etc. can be added in order to prevent word, the blood serum of the minor or human, and the contamination of the microorganism.

상기 공동배양과정은 세포이식을 위하여 사이토카인이나 혈청을 넣어주지 않고 수행되며, 성체줄기세포에서 분비되는 자극제의 영향으로 제대혈 유래 CD34+, Thy 1.1+, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-세포가 증식된다.

The cytokine or the blood serum is not put and the co-cultivation process is performed for the cell transplantation. And the umbilical cord blood originated CD 34 + , thy 1.1 + , CD 45 + , KDR + , CD 38 - and lin - cell are proliferated the stimulant which the adult stem cell secretes.

#### 4. 조혈모세포 및 전구세포의 배양 및 증식 확인

4. The cultivation of the hematopoietic stem cell and precursor cell and proliferation confirmation .

증식된 세포의 갯수 및 유형은 유동 세포측정, 세포 분류, 면역세포화학(예를 들어, 조직 특이성 또는 세포-표지 특이적 항체로 염색시킴), 형광 활성화 세포 분류(fluorescence activated cell sorting, FACS), 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting, MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하는 형태 및 세포의 표면 표지에서의 변화를 측정하거나, 광학 현미경 또는 공초점(confocal) 현미경을 사용하여 세포의 형태를 검사하거나, 또는 PCR 및 유전자 발현 프로파일링(profiling)과 같이 당해 분야에 잘 공지된 기술을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정함으로써 쉽게 모니터링될 수 있다.

The change at the surface marker of the number of proliferated cells and form using the type is the standard cell detection technique like the flow-cytometric analysis, cell sorting, the immunocytochemistry (it dyes for example to the tissular peculiarity or the cell - cover specific antibody), the fluorescence-activated cell sorting (fluorescence activated cell sorting, FACS), the self activation cell sorting (magnetic activated cell sorting, MACS) and cell are measured or the form of the cell is inspected using the optical microscope or the confocal microscope or since it experiences like PCR and gene expression profiling and the change at the gene expression is measured using the technology which is known to have the well in field the change can be monitored at the easily.

바람직한 실시양태에서, 태반에서 배양된 세포는 당해 분야에 공지된 기법, 예를 들어 밀도 구배 원심분리, 자석 세포분리, 유세포분석기, 또는 다른 세포 분리법을 사용하여, 또는 당해 분야에 공지된 분류 방법을 사용하여 분류된다.

In a preferred embodiment, the cell cultivated in the placenta experiences and the other cell separation technique experience and or it is classified using the technique, which is known to have in field for example, the density gradient centrifugation, the magnet cell sorting, and the Flow Cytometer or the other cell separation technique using the classification method which is known in field.

일례로, 목적의 표면항원을 발현하고 있는 세포를 수득하는 방법으로서의 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(Int. Immunol., 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 해당 세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법(J. Immunol., 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법도 있다.

For example, it has the flow cytometer having sorting function method using the FACS method (Int. Immunol., 10(3):275, 1998) used, and the magnetism biz, and the panning (J. Immunol., 141(8):2797, 1998) etc using the antibody which specifically recognizes the corresponding cell as the method of obtaining the cell which is revealed the surface antigen of the purpose. Moreover, it has the method of using as the column the singleness or this the antibody which specifically recognizes clearly in assemblies.

플로우 사이토미터 소팅 방식으로서는, 수적하전 방식, 셀 캡처 방식 등을 들 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 표면 표지-특이적 항체 또는 리간드는 분명한 형광 라벨로 표지된다. 세포는 세포 분류기를 통해 처리되어 그들의 사용된 항체에 대한 결합능력에 기초하여 세포가 분리된다. FACS-분류된 입자는 96웰 또는 384웰 플레이트의 개별 웰(well)내에 직접 침착되어 분리 및 클로닝을 촉진시킬 수 있다.

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

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

상기 배양 및 증식된 세포의 확인은, 조혈모세포 또는 전구세포에서 발현되는 세포표면항원에 대한 항체중에서 선택된 하나 이상의 항체를 사용 가능하다. 즉, 상기 배양 및 증식 방법에서, 조혈모세포 또는 전구세포의 특이항원에 대한 항체로서 CD34+, Thy 1.1+, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-를 사용 가능하고, 특히, 바람직하게는 항원인 CD34+에 대한 항체를 사용하는 것이다.

또한, 상기 항체에 형광물질 또는 마그네틱 마이크로비드가 부착된 항체도 사용할 수 있는데, 바람직하게는 마그네틱 마이크로비드가 부착된 CD34+항체를 사용한다.

CD34 항원은 분자량 116 kDa의 글리코포스포프로테인으로, 1번 염색체의 장완에 그 유전자가 존재하고 있으며, 정상 골수 세포의 1~2% 정도에서 발현 되는데, 특히 조

As the flow cytometer sorting mode, the number dropping front type, the cell capture mode etc. can be given. In one embodiment, it is marked by the it is evident fluorescently label. The cell is handled through the cell sorter and the cell is separated based on the combining ability about their used antibodies. The particle classified with FACS- is sunk to the directly within the discrete well of 96 well or 384 well plate and the separation and cloning can be accelerated.

Antibody which specifically recognizes clearly the surface antigen of the cell through any method is noted by fluorescence. The fluorescence about the incorporate body of the marked antibody and antigen are measured and the fluorescence intensity is converted into the electric signal antibody has the revelation of antigen amount of the cell. Moreover, the kind of the fluorescent material used is assembled it is possible to separate the cell expressing multiple surface antigens. Here, the usable fluorescent material may be the FITC, the PE (phycoerythrin), the APC (allo-phycoyanin), the TR (TexasRed), the Cy3, the CyChrome, the Red613, the Red670, the TRI-Color, the QuantumRed etc.

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

At least one antibody selected between antibody to the cell surface antigen which the proliferated confirmation of the cell and cultivation is revealed in the hematopoietic stem cell or the precursor cell is usable. That is, as antibody to the special antigen of the hematopoietic stem cell or the precursor cell in cultivation and propagating method to use the antibody about CD 34 + called the antigen the CD 34 + , thy 1.1 + , CD 45 + , KDR + , CD 38 - and lin - are usable.

Moreover, the antibody in which the fluorescent material or the magnetic MI coro bead is adhered to the antibody can use. The CD 34 + antibody in which preferably the magnetic microbead is adhered is used.

The gene the CD34 antigen exists in the field of one time chromosome as the glyco phospho protein of the molecular weight 116 kDa. And the glyco p

기 조혈 전구세포에서 흔히 발현된다. 최근 인간의 조혈 줄기세포의 표면형질 하나인 CD34 양성 세포가 베토 활성(veto activity)을 가진다는 것이 보고되었다. 베토 세포는 전통적으로 CD8 양성인 면서, Fas 리간드와 class I MHC를 발현하는 세포로서, 동종 줄기 세포 이식에서 면역 거부반응을 담당하는 T 임파구 클론에 대해 선택적으로 세포사를 유발함으로써 이식된 생착편의 생존을 증가시키는 기능을 가지는 세포라 하여 일명 촉진 세포(facilitating cell)라고 불리기도 하였다. 이러한 베토 세포 활성은 골수의 CD34 양성 줄기세포에 거의 편중되어 나타난다.

상기 과정을 통해 수득 가능한 본 발명의 세포는 제대혈 유래 조혈모세포 (CD34+, Thy 1.1 +, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-세포)이다. 즉, 본 발명의 방법에 따라 수득한 제대혈 유래 조혈모세포 또는 전구세포는 면역표현형 특성에 있어서, CD34, cd133, C-kit, CD117, CD45, Thy 1.1, 및 KDR에 대한 항체에 대해 양성 반응을 나타내며, CD38 및 lin에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타낸다.

본 발명에서 수득한 제대혈 유래 CD34+, Thy 1.1 +, CD45+, KDR+, CD38-, 및 lin-세포는, 인슐린, 트랜스페린, 셀레늄, 우혈청알부민, 리놀렌산 등을, 세포배양 배지, 즉 DMEM,  $\alpha$ -MEM, McCoy5A, Eagle#39#s basal, CMRL, IMDM 배지 등 일반적으로 사용되는 세포배양용 배지 중 선택된 하나에 첨가하여 사용할 수 있고, 바람직하게는 RPMI-1640 세포 배양액을 사용한다.

또한 본 발명에서 사용하는 세포배양 배지 역시, 상기 성분 이외에도 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 추가로 함유할 수 있다. 예를 들어 말, 소 또는 사람의 혈청, 미생물의 오염을 막기 위해 페니실린, 스트렙토마이신 설페이트, 암포테리신 B, 젠타마이신, 또는 니스타틴 등의 항생제 및 항진균제들을 추가할 수 있다.

#### 실시예

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

특히, 하기 실시예에서는 제대혈 유래 조혈모세포, 전구세포 및 태반 유래 성체줄기세포를 기술하고 있으나, 이 밖

hospho protein is revealed in about 1~2% of the normal marrow cell. About 1~2% is revealed in especially, the initial hematopoietic precursor cell. Recently, it was reported that the CD34 positive cell called one among the surface type of the hematogenesis stem cell of human had the veto activity (veto activity). It said to be cell having the function while the traditionally the veto cell is the CD8 positivity being the cell expressing the Fas ligand and class I MHC and of increasing the engraft convenience alive which is transplanted by selectively causing the cell death about the T-type lymph cell clone managing the immune rejection in the formula and it was called as another name promotion cell (facilitating cell). This veto cell activating nearly flows into the CD34 positivity stem cell of the bone marrow and it shows up.

The cell of the present invention enabling to gain through the process may be umbilical cord blood originated hematopoietic stem cell (the CD 34 + , thy 1.1 + , CD 45 + , KDR + , CD 38 - and lin - cell). That is, the positive reaction about antibody to the obtained umbilical cord blood originated hematopoietic stem cell or the precursor cell is the CD34, the cd133, the C-kit, the CD117, the CD45, the Thy 1.1 as to the immunophenotype property, and KDR according to the method of the present invention are shown. And the negative response is shown about antibody to the CD38 and lin.

In the present invention, the umbilical cord blood originated CD 34 + , the Thy 1.1 + , the CD 45 + , the KDR + , the CD 38 - and the obtained lin - cell may be formed of the RPMI - 1640 cell broth it one selected from the culture medium for the cell culture which is generally used the insulin, the transferrin, selenium, the bovine serum albumin, the linolenic acid etc the cell culture medium, in other words, the DMEM,  $\alpha$  -MEM, the McCoy5A, the Eagle's basal, CMRL, the IMDM culture medium etc adds.

Moreover, in the present invention, the cell culture medium used additionally can contain the assistant ingredient more than one besides the component as necessary. For example, the penicillin, streptomycin sulfate, AMPH, gentamycin or the nystatin, including, the antibiotic and antifungus agent etc. can be added in order to prevent word, the blood serum of the minor or human, and the contamination of the microorganism.

#### Embodiment .

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.

Particularly, in the following embodiment, the umbilical cord blood originated hematopoietic stem

에도 인간 말초혈액, 골수 및 제대혈 등에서 유래한 조혈 모세포 및 전구세포, 그리고, 골수, 제대혈, 혈액, 간장, 피부, 위장관, 태반, 및 자궁 등의 인간조직 유래 성체 줄기 세포를 사용할 수 있는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1 : 제대혈 유래 단핵세포구의 수득

(1) 제대혈 유래 단핵세포구 수집 (cell collection)

제대혈은 위원회지침서에 따라 고려대학교 산부인과에서 정상 분만과 조산분만에서 수집하였다. 혈액은 시트르산-인산-덱스트로즈 항응혈제 (citrate-phosphate-dextrose anticoagulant, CPDA)가 포함되어 있는 250 ml 표준 혈액수집백 (standard blood bag, 녹십자, 한국)에 수집되었다.

냉동 보관 되어 있던 제대혈을 37 ℃ 항온조에 넣어 천천히 흔들면서 해동시킨 후 50 ml 튜브로 옮겨, 1000 rpm, 3 min의 조건하에서 원심 분리하였다. 원심분리후 침전물로부터 적혈구를 제거 하기 위하여 적혈구 용해용 버퍼를 이용하여 적혈구를 용해시킨 후 위와 동일한 조건으로 다시 한 번 원심분리를 실시하였다. 최종 침전물을 단핵세포구로 실험에 이용하였다.

(2) CD34+ 세포의 정량

양성선별 후 즉시, CD34+ 세포들은 면역조직화학법에 의해 동정되고 정량화 되었다. 이것은 상용화 키트를 이용하여 CD34+ 항원을 지향하기 위한 특이 단일 클론 항체를 사용하였다. 40 X 103개의 세포를 포함하고 슬라이드는 제조사의 지시에 따라 전과정을 시행하였다.

실시예 2 : 성체줄기세포의 수득

(1) 태반을 비롯한 조직의 준비

태반조직은 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산분만에서 수집되었고, 지방의 경우 아산 병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 아산병원에서 수집되어 연구용으로 사용되었다. 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수에 넣어서 연구실까지 옮겼다.

연구실로 옮긴 조직은 PBS를 이용하여 세척하여 혈구세

m cell, and the precursor cell and placenta originated adult stem cell are described. But it has to a person skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry to use the human tissue originated adult stem cell including the hematopoietic stem cell, besides derived from the human peripheral blood, the bone marrow and umbilical cord blood etc. with the precursor cell, bone marrow, umbilical cord blood, blood, soy sauce, skin, gastrointestinal tract, placenta and womb etc.

embodiment 1 : umbilical cord blood originated monocyte old friendship acquisition .

(1) Umbilical cord blood originated monocyte globe collection (cell collection)

According to the umbilical cord blood is the committee tutorial, Korea university obstetrics and gynecology collected in the eutocia and the premature birth childbirth. It was collected.

It centrifuged at under the conditions of 1000 rpm, 3 min the umbilical cord blood kept with freezing is placed on 37 ℃ thermostat. After subjecting the red blood cell to hemolysis using the buffer for the erythrocytolysis in order to hit after the centrifugation remove the red blood cell from cloth the centrifugation was again performed to the gastric duct same condition. The final deposit was used for the experiment as the monocyte outlet.

(2) The fixed quantity of the CD34+ cell.

It became the realtime , and CD34+ cells after the positive selection with the immunohistochemical method with identification and it was quantized. This may be formed of the extra-large for aiming at the CD34+ antigen using the commercialization kit is the monoclonal antibody. The cell of 40 X 10<sup>3</sup> was included and the slide implemented the entire steps according to the indication of the manufacturer.

embodiment 2: the acquisition of adult stem cell .

(1) The preparation from the organization including the placenta.

According to the placenta tissue is the Korea university hospital clinical test Ethics Advisory Board tutorial, it was collected by the Korea university annex Kuro hospital in the eutocia and the premature birth childbirth. It was collected by the Ahsan hospital according to the Ahsan hospital clinical test Ethics Advisory Board tutorial and it was used in case of the fat for the research. It put into the saline solution containing the organization is the antibiotic and it moved to the laboratory.

The organization gone to the laboratory washed

분들과 여러 조직의 잔해들을 제거하거나 조직을 용혈 버퍼(hemolysis buffer)를 이용하여 혈구세포들을 제거하였다.

(2) 태반조직 유래 줄기세포의 분리 및 배양

분리된 각각의 태반 조직들은 100Φ디쉬에 놓고 멸균된 메쉬를 이용해 1~2mm 크기로 잘게 세절하였다. 그 후, 콜라게나제가 포함된 배지에 놓고 37℃의 배양기에서 최소 1 시간에서 최대 4시간 동안 반응시킨 다음 100 와이어 직물체를 이용해 콜라게나제가 처리된 조직을 걸었다. 이렇게 분리한 세포들은 100mm 디쉬에 37℃, 5% CO2 조건하 DMEM배지에서 배양하였다. 상피모세포의 경우에는 유사한 공정을 사용하되 트립신을 이용하여 분리 및 배양하였다.

실시예 3 : 제대혈 유래 단핵세포구와성체줄기세포의 공동 배양

6-웰 배양 플라스크에 2 X 10<sup>6</sup>개의 기질 세포를 플레이팅했고, 단핵세포구는 기질세포들이 90 % 의 컨플루언스보다 훨씬 높아질 때쯤 접종하였다.

공동배양하는 시점에서 성체줄기세포는 단핵세포구를 넣어주기 전에 다섯 번 PBS로 세척하였다. 미리 무혈청 RPMI-1640 배지에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양한 성체줄기세포의 단층에 1.0 X 10<sup>5</sup>개의 단핵세포구를 접종하였다.

실시예 4 : 조혈모세포의 증식 확인

공동배양시 매일 비부착성/부착성 조혈세포는 조심스럽게 파이펫팅하여 수거하였다. 부유하여 있는 코블스톤-형성 조혈성 세포 밑에 위치하는 성체줄기세포는 배양 플라스크에 남겨지고, 수거된 조혈성 세포 중 생명력 있는 세포의 총 수는 트립판 블루 염색법과 형광면역세포분리기를 이용하여 혈구계수기를 통해 계수하였다.

[표 1]

상기 표1은 본 발명의 단핵세포구를, 태반 조직 유래의 중간엽 줄기세포 또는, 중간엽 줄기세포와 다른 특성을 가지는 상피모세포와 각각 공동 배양한 후의 세포수에 대한 도표이다. 상기 표에서 확인 할 수 있는 것처럼, 조혈모세포는 성체줄기세포인 태반 유래 줄기세포 또는 상피모세포와 공동 배양한 때, 24시간, 48시간, 72시간 동안 증가한 양상을 나타내었다.

using PBS and the debris of the different organization and blood cells were removed or tissue blood cells was removed using the hemolysis buffer.

(2) The separation and cultivation of the placenta tissue originated stem cell.

It using the sterilized mesh separated each placenta tissues place on 100Φ dish small pieces sliced to 1~2mm size. Thereafter, using 100 wire fabric it places on the culture medium containing collagenase and it reacts at the minimum 1 hour in the culture medium of 37℃ for the maximum 4 hours, the organization in which the collagenase was processed was skipped over. In this way, cells separated cultivated in 100mm dish in 37℃, 5% CO<sub>2</sub> under condition DMEM medium. In the epithelium hair cell, the process of being similar was used and it cultivated using trypsin with the separation.

embodiment 3: the co-cultivation of the umbilical cord blood originated monocyte stomodaeum adult stem cell .

The stromal cell of 2 X 10<sup>6</sup> was plated on 6- well culture flask. The monocyte outlet inoculated when stromal cells were more enhanced than the confluence of 90 % .

In the point of time when cultivating jointly, it washed to the five burn PBS before the adult stem cell put the monocyte outlet. Beforehand, in the serum-free RPMI -1640 medium, the monocyte outlet of 1.0 X 10<sup>5</sup> was inoculated with the single layer of the adult stem cell cultivated to 37℃, and the condition of 5% CO<sub>2</sub>.

embodiment 4: the proliferation confirmation of the hematopoietic stem cell.

It carefuly it was the pipetting and everyday the anchorage-independence / cohesive property hematopoietic cell took away in the co-cultivation. The adult stem cell positioned under the float cobble 50- formation hemopoiesic cell remained in the culture flask. The total count of the cell having among the hemopoiesic cell taken away with vitality succeeded using the trypan blue dye exclusion method and fluorescence immunity cell sorter through the blood cell counter.

[Table 1]

The table 1 is the monocyte outlet of the present invention may be referred to the graph for the respective cell number after cultivating jointly and the epithelium hair cell having the property different from the mesenchyme stem cell of the placenta tissue originated or the mesenchyme stem cell. The hematopoietic stem cell it can confirm in table exhibits the mode which when cultivates jointly with the placenta originated stem cell called the adult stem cell or the epithelium hair cell increases for 24 h

ours, 48 hours, 72 hours.

또한, 도 1a 내지 도 1c에서 알 수 있는 것처럼, 상기 수득된 CD34+ 세포는 4일 동안 증가한 양상을 나타내었다. 즉, 기존의 성장인자를 넣어준 배양 방법, 공동 배양 이전에 조혈모세포를 선분리하여 배양한 방법보다, 본 발명의 단핵세포구의 형태로 성체줄기세포와의 공동배양하는 방법에서 조혈모세포 또는 전구세포는 더욱 뛰어난 증식효과를 나타내었다.

Moreover, the obtained CD 34 + cell as described above it can know at the figures 1a through 1c exhibit the mode increasing for 4. That is, the culture method letting the existing growth factor, and the hematopoietic stem cell or the precursor cell in the method for cultivating jointly with the adult stem cell in the form of the monocyte outlet of the present invention than the method, which it cultivates the hematopoietic stem cell is pre-separated previously the co-cultivation exhibit more, the excellent the multiplication effect.

### 도면에 대한 간단한 설명

도 1a 내지 1c는 제대혈 유래 단핵세포구 및 성체줄기세포와의 공동배양 후, 형광면역세포분리기에 의해 분리된 조혈모세포 CD34+세포의 시간별 세포수 변화를 나타낸 그래프이다[도 1a: 24시간일 때의 CD34+ 세포수; 도 1b: 48시간일 때의 CD34+ 세포수; 도 1c: 72시간일 때의 CD34+ 세포수].

### Brief explanation of the drawing

Figures 1a through 1c are graph showing the hourly cell number change of the hematopoietic stem cell CD34+ cell which the fluorescence immuno cytometry cell sorter divides after the co-cultivation between the umbilical cord blood originated monocyte outlet and the adult stem cell.

### 면책안내

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

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