

## Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/074   C12N 5/077   C12N 5/079
Published Date	20081205
Registration No.	1008719840000
Registration Date	20081128
Application No.	1020070007139
Application Date	20070123
Unexamined Publication No.	1020070101756
Unexamined Publication Date	20071017
Priority Claims	1020060033325   20060412   KR
Requested Date of Examination	20070123
Agent.	LEECHYOYOUNG
Inventor	RA,JUNG-CHAN   KIM, bong hui   LEE, hang young   WOO, SANG KYU   PARK Hanna   KIM HYOEUN
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

## 발명의 명칭

태반 조직 유래 다능성 줄기세포 및 이를 함유하는 세포치료제

## Title of Invention

Placenta tissue originated multipotent stem cells and cell therapy product including the same.

## 요약

본 발명은 태반 조직 유래 다능성 줄기세포 및 이를 함유하는 세포치료제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 세절한 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 bFGF 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지(sphere-forming medium)에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 태반 줄기세포의 제조 방법 및 수득된 태반 줄기세포에 관한 것이다. 본 발명에 따른 다능성 줄기세포는 근세포, 혈관내피세포, 골형성 세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 연골형성 세포, 골형성 세포, 또는 인슐린 분비 체장 베타세포로 분화하는 능력을 가지고 있어, 근질환, 골다공증, 골관절염, 신경질환, 당뇨병 등의 치료에 효과적이고, 유방 조직 형성에 유용하다.

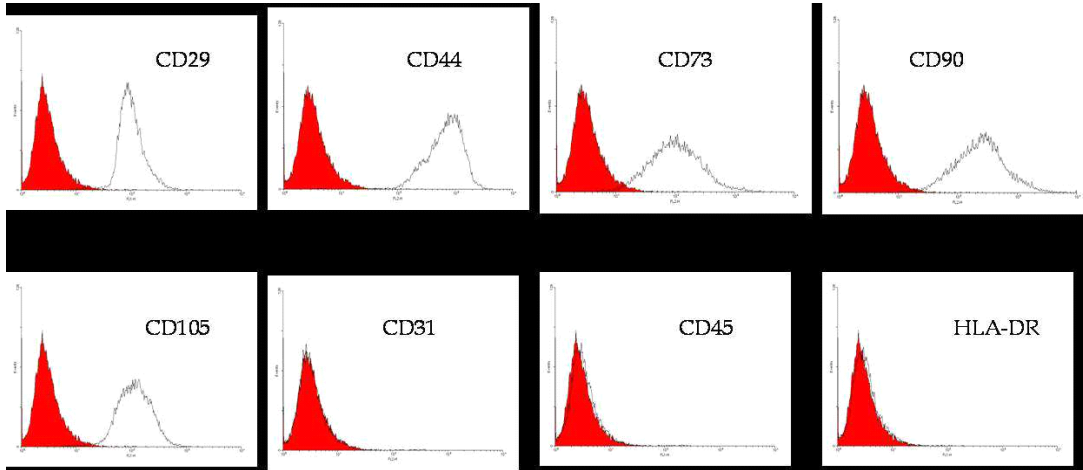
태반 조직, 태반 줄기세포, 분화, 세포치료제

## Abstract

The invention relates to the placenta tissue originated multipotent stem cells and the cell therapy product including the same, and more specifically, to the manufacturing method and the obtained placental stem cell of the placental stem cell having the capability which altogether shows the immunological characteristic of the positivity about (a) CD29, the CD44, the CD73, the CD90 and the CD105 which collects after cultivating the amnion, which slices curtain, and the decidua basalis or the placenta tissue in the bFGF contained culture medium and it altogether shows the immunological characteristic of voice about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR HLA-DR show the immunological characteristic of the positivity about (b) Oct4 and SSEA4 it is adhered to (c) plastic and it grows and shows the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) and it forms the sphere at the SFM culture medium (sphere-forming medium) and specializes in (d) mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin. The long-term maintenance is possible through the undivided condition. The multipotent stem cells according to the present invention is useful in the breast tissue formation it is effective for the treatment of the myo

pathy, the osteoporosis, the osteoarthritis, the neural disease, the diabetes etc it has the capability specializing in the myocyte, the blood vessel endothelial cell, the bony osteogenesis cell, the nerve cell, the astrocyte, the fat cell, the cartilage formatting cell, the bony osteogenesis cell or the insulin secretion pancreatic beta cell.  
The placenta tissue, the placental stem cell, the differentiation, the cell therapy product .

**대표도면 (Representative drawing)**



**청구의 범위**

**청구 1항:**

인간 태반 조직의 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 bFGF함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, 다음과 같은 특성을 나타내는 성체 줄기세포의 제조방법:: (a) CD29, CD44, CD54, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

**청구 2항:**

제1항의 방법에 의해 수득한, 다음과 같은 특성을 나타내는 태반 줄기세포: (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을

**Scope of Claims**

**Claim 1:**

The manufacturing method of the adult stem cell which it collects it cultivates the amnion of the human placenta tissue, curtain, and the decidua basalis or the placenta tissue in the bFGF containing culture medium and which shows the property as follows:: the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about (a) CD29, CD44, CD54, CD73, CD90 and CD105 ; the immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR the immunological characteristic of the positivity is shown about : (b) Oct4 and SSEA4 it is adhered to : (c) plastic and it grows ; the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) is shown ; and the sphere is formed at the SFM culture medium and it has the capability specializing in (d) mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin the long-term maintenance is possible through the undivided condition.

**Claim 2:**

The placental stem cell which it obtains with the method of claim 1 and which shows the property as follows: the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about (a) CD29, CD44, CD73, CD90

나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성의 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가짐.

and CD105 ; the immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR the immunological characteristic of the positivity is shown about : (b) Oct4 and SSEA4 the immunological characteristic is adhered to : (c) plastic and the immunological characteristic grows ; the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) is shown ; and the sphere is formed at the SFM culture medium and CD105 have the capability specializing in (d) mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin the long-term maintenance is possible through the undivided condition.

**청구 3항:**

제2항에 있어서, 상기 중배엽 유래 세포는 근세포, 골형성 세포, 연골세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 인슐린 분비 세포 또는 혈관내피세포(endothelial cell)인 것을 특징으로 하는 태반 줄기세포.

**Claim 3:**

As for claim 2, the placental stem cell called the mesoderm cellular origin is the myocyte, bony osteogenesis cell, cartilage cell, nerve cell, astrocyte, fat cell, insulin secretion pancreas or the blood vessel endothelial cell.

**청구 4항:**

제2항의 태반 줄기세포를 하루 동안 아자사이티딘(azacytidine)을 전처리 한 후 SKBM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 근세포로 분화시키는 방법.

**Claim 4:**

The method of letting differentiate as the myocyte the placental stem cell which it cultivates in the SKBM culture medium after pre-processing the azacytidine for day of claim 2.

**청구 5항:**

제4항의 방법에 의해 분화된 근세포를 유효성분으로 함유하는 근질환 치료용 세포 치료제.

**Claim 5:**

The cell therapy product for the myopathy treatment containing the myocyte specialized with the method as an active ingredient of claim 4.

**청구 6항:**

다음의 단계를 포함하는, 태반 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법: (a) 제2항의 태반 줄기세포를 BME 및 FBS를 함유한 DMEM 배지에 전배양 하는 단계; 및 (b) 상기 전배양액을 DMSO 및 BHA로 처리하여 신경분화를 유도하는 단계.

**Claim 6:**

The method of letting differentiate as the nerve cell the placental stem cell including the following step: the step of inducing the neuronal differentiation it processes as DMSO and BHA in the DMEM medium containing BME the placental stem cell of (a) second claim and FBS.

**청구 7항:**

제6항의 방법에 의해 분화된 신경세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.

**Claim 7:**

The treatment of neurological disorder cell therapy product containing the nerve cell specialized with the method as an active ingredient of claim 6.

**청구 8항:**

제2항의 태반 줄기세포를 TCP(Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 골형성 세포로 분화시키는 방법.

**Claim 8:**

The method of differentiating the placental stem cell which is characterized to the bony osteogenesis cell the ectopic implantation is it mixes with the TCP (Tricalcium phosphate) of claim 2.

**청구 9항:**

제8항의 방법에 의해 분화된 골형성세포를 유효성분으로 함유하는 골다공증 치료용 세포 치료제.

**Claim 9:**

The cell therapy product for the treatment of osteoporosis containing the bony osteogenesis cell specialized with the method as an active ingredient of claim 8.

**청구 10항:**

**Claim 10:**

제2항의 태반 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 인슐린 및 IBMX를 함유한 $\alpha$ -MEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 지방세포로 분화시키는 방법.	The method of letting differentiate as the fat cell the placental stem cell cultivated in $\alpha$ -MEM culture medium containing the dexamethasone the placental stem cell, the indomethacin, and insulin and IBMX of claim 2.
<b>청구 11항:</b>	Claim 11:
제10항의 방법에 의해 분화된 지방세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.	The cell therapy product for the breast tissue formation containing the fat cell specialized with the method as an active ingredient of claim 10.
<b>청구 12항:</b>	Claim 12:
제2항의 태반 줄기세포를 MSCGM 및 TGF-베타-3을 함유한 DMEM 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 태반 줄기세포를 연골세포로 분화시키는 방법.	The method of letting differentiate as the cartilage cell the placental stem cell cultivated in DMEM medium containing MSCGM the placental stem cell and TGF- $\beta$ -3 of claim 2.
<b>청구 13항:</b>	Claim 13:
제12항의 방법에 의해 분화된 연골세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.	The cell therapy product for the treatment of osteoarthritis containing the cartilage cell specialized with the method as an active ingredient of claim 12.
<b>청구 14항:</b>	Claim 14:
다음의 단계를 포함하는 태반 줄기세포를 인슐린 분비 췌장 베타세포로 분화시키는 방법: (a) 제2항의 태반 줄기세포를 염기성 섬유아세포 성장인자와 트랜스포밍 성장 인자 베타-1으로 보충된 DMEM/20% CBS에서 배양하는 단계; 및 (b) 네스틴(nestin)-양성 신경단위 세포 배양들로부터 온 조건화된 배지를 50/50 농도로 배지에 첨가하여 배양하는 단계.	The method of letting differentiate as the insulin secretion pancreatic beta cell the placental stem cell including the following step: the step : (b) cultivating the placental stem cell of (a) second claim in the basic fibroblast growth factor and the DMEM / 20% CBS supplemented as the transforming growth factor $\beta$ -1 and the step that adds the culture medium which comes from nestin - positivity *** cell cultures making as a condition to 50/50 concentration in the culture medium and cultivated.
<b>청구 15항:</b>	Claim 15:
제14항의 방법에 의해 분화된 인슐린 분비 췌장 베타세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.	The diabetes-curing cell therapy product containing the insulin secretion pancreatic beta cell specialized with the method as an active ingredient of claim 14.
<b>청구 16항:</b>	Claim 16:
근세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 근질환 치료용 세포 치료제.	The cell therapy product for the myopathy treatment containing placental stem cell as an active ingredient of claim 2 having the property of being specialized to the myocyte.
<b>청구 17항:</b>	Claim 17:
신경세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 신경질환 치료용 세포 치료제.	The treatment of neurological disorder cell therapy product containing placental stem cell as an active ingredient of claim 2 having the property of being specialized to the nerve cell.
<b>청구 18항:</b>	Claim 18:
연골세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골관절염 치료용 세포 치료제.	The cell therapy product for the treatment of osteoarthritis containing placental stem cell as an active ingredient of claim 2 having the property of being specialized to the cartilage cell.

**청구 19항:**

골형성 세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 골다공증 치료용 세포 치료제.

**Claim 19:**

The cell therapy product for the treatment of osteoporosis containing placental stem cell as an active ingredient of claim 2 having the property of being specialized to the bony osteogenesis cell.

**청구 20항:**

지방세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 유방 조직 형성용 세포 치료제.

**Claim 20:**

The cell therapy product for the breast tissue formation containing placental stem cell as an active ingredient of claim 2 having the property of being specialized to the fat cell.

**청구 21항:**

인슐린 분비 체장 베타세포로 분화되는 특성을 가지는 제2항의 태반 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 치료용 세포 치료제.

**Claim 21:**

The diabetes-curing cell therapy product containing placental stem cell as an active ingredient of claim 2 having the property of being specialized to the insulin secretion pancreatic beta cell.

**배경기술**

본 발명은 태반 조직 유래 다능성 줄기세포 및 이를 함유하는 세포치료제에 관한 것으로, 본 발명은 (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 특성을 나타내는 태반 줄기세포에 관한 것이다.

**Background Art**

The invention relates to the invention as the placenta tissue originated multipotent stem cells and the cell therapy product including the same, is (a) CD29, the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about the CD44, the CD73, and the CD90 and CD105. The immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR the immunological characteristic of the positivity is shown about (b) Oct4 and SSEA4 it is adhered to (c) plastic and it grows. And the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) is shown. The sphere is formed at the SFM culture medium and the long-term maintenance is possible with the undivided condition, and the placental stem cell showing property having the capability specializing in (d) mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin.

21세기의 생명공학은 인간복지를 최종목표로 식량, 환경, 건강 문제에 새로운 해결책의 가능성을 제시하고 있으며, 최근에 줄기세포의 이용기술은 난치병 치료의 새로운 장으로 떠오르고 있다. 이전까지는 인간의 난치병 치료를 위해 장기이식이나 유전자 치료 등이 제시되었으나, 면역거부와 공급 장기 부족, 백터개발이나 질환유전자에 대한 지식부족으로 효율적인 실용화가 미진하였다.

The genetic engineering of 21 intensity presents the possibility of the new solution the human welfare as the final target to the capacity for eating, the environment, and the health problem. And the utilizing technology of the stem cell rises to the sky as the new field of the incurable disease treatment. The organ transfer or the gene therapy etc. were presented for the incurable disease treatment of human to the previous. But the efficient put to practical use was incomplete to the immunological rejection and supply long-term shortage, and the knowledge deficit to the vector development or the causative gene.

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

Thus, it was recognized that pluripotent stem cell having the capability in which the concern about the stem cell research is increased and forming all boilers through proliferation and differentiation fundamentally could solve the long-term damage as well as the most of treatment of illnesses. Moreover, until many scientist nearly told of the human body to the treatment including the parkinson's disease, which was the intractable disease as well as all long-plaies all kinds of the cancers, the diabetes and spinal cord injury etc. it was various t

he applicability of the stem cell had been being present ed.

줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전능성(전분화능) 줄기세포(pluripotent stem cells), 다능성(다분화능) 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.

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 totipotency (totipotency) stem cell (pluripotent stem cells), and the versatility (multipotent) stem cell (multipotent stem cells).

만능 줄기세포(totipotent stem cells)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 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. 다능성(다능성) 줄기세포(multipotent stem cells)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관을 형성하는 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포이다.

The pluripotent stem cell (totipotent stem cells) has the property thereafter that the cell to 8 cell group is like that with the correction of one complete entity the cell having the property of the pluripotent which can be generated the ovum and correct letter. And if this cell is separated and it transplants to the womb it can be generated as one complete entity. The pluripotent stem cell (pluripotent stem cells) is that the new life 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 organization containing the versatility (versatility) stem cell (multipotent stem cells) is this cell and boiler may be referred to the stem cell specializing in the specific cell forming.

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

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

이에 대해, 최근, 지방 조직이 다능성 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다(B.Cousin et al., *BBRC.*, 301:1016, 2003; A. Miranville et al., *Circulation*, 110:349, 2004; S. Gronthos et al., *J. Cell Physiol.*, 189:54, 2001; M.J.Seo et al., *BBRC.*, 328:258, 2005). 즉, 지방흡입(liposuction)에 의해 얻어진 인간 지방조직에 미분화 세포군이 포함되어 있고, 이것은 in vitro상에서 지방세포, 골형성세포, 근원세포 및 연골모세포로의 분화능을 갖는 세포라는 사실이 보고되었다(P. A.Zuk et al., *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M Rodriguez et al., *BBRC.*, 315:255, 2004). 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점이 있어, 기존의 단점을 보완하는 새로운 줄기세포의 소스로 주목받고 있는 것이다. 또한, 최근 연구에서는 지방 조직 유래 세포가 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있음이 동물 모델 실험을 통하여 알려짐으로써, 줄기세포의 새로운 소스로서 두각을 나타내고 있다.

With respect to this, recently, the fact called the new source of the multipotent stem cells cell having this is the fat cell on in vitro, the bony osteogenesis cell, and the blastogenesis to the sarcoblast and precartilage of the adipose tissue was reported (P.A.Zuk et al., *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; A.M Rodriguez et al., *BBRC.*, 315:255, 2004). It has the advantage that this adipose tissue massively can extract. It paid attention to the source of the new stem cell complementing the existing disadvantage. Moreover, in the recent research, the adipose tissue cellular origin promotes the muscle play performance and vasa nervorum differentiation capability is known via the animal model experiment that it has the capability in which. In that way it distinguishes as the new source of the stem cell.

최근 이러한 인간 줄기세포의 동정, 격리 및 발생에 대한 관심이 크다. 인간 줄기세포는 다양한 성인 세포 계통을 발생시킬

Recently, the identification of such human stem cell, and the concern for the generation and isolation are cr

수 있는 전능성(totipotential) 또는 만능성(pluripotential) 전구체 세포이다. 이 능력은 기관 및 조직 발달에 필요한 세포의 분화와 특수화를 위한 기초로서 작용한다. 최근, 이러한 줄기세포 이식이 성공함에 따라, 질환, 독성 화학물질 및/또는 방사선으로의 노출로 인한 골용해(myeloablation) 이후 골수를 재구성하고/하거나 보충하는 신규한 임상 도구가 제공되었다. 줄기세포가 다수의 조직을 모두는 아니지만 재증식시키고 생리학적 및 해부학적 기능을 회복시키는데 사용될 수 있음을 입증하는 추가의 증거가 존재한다. 또한, 조직 공학, 유전자 치료 분만 및 세포 치료제에서의 줄기세포의 적용이 급속도로 진행되고 있다. 따라서 현재 당업계에서는 줄기세포에 대한 관심이 증대되면서, 다양한 조직으로부터 줄기세포의 개발 및 제조가 절실히 요구되고 있는 상황이다.

ucial. The human stem cell is the various adult cell line ages may be referred to the totipotency (totipotential) or the versatility (pluripotential) precursor cell can generate. It acts as the basis for the differentiation of the cell necessary for this capability is the boiler and tissue development and specialization. Recently, provided is the novel clinical tool which as this stem cell transplantation succeeds in thereafter it reconstructs the bone marrow with the disease, and the myeloablation (myeloablation) due to the exposure to the toxic chemical agent and/or radiation and it does or it supplements. The additional evidence which proves that it is not everyone but the stem cell re-multiplies multiple organizations and it physiological it anatomical it makes the function turn around but the function can be used exists. Moreover, the histotechnology, and the application of the stem cell at the gene therapy childbirth and cell therapy product are rapidly progressed. Therefore, presently, in the relevant industry, while the concern about the stem cell increases it is the situation where development and manufacture of the stem cell are desperately required from various organizations.

## 발명의 내용

## Summary of Invention

### 발명의 효과

### Effects of the Invention

이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명에 따른 태반 조직을 이용한 태반 줄기세포의 제조방법은 기존의 다른 조직으로부터 줄기세포를 제조하는 것과 비교해서, 더 효율적으로 생산할 수 있고, 본 발명에 따른 다능성 줄기세포는 근세포, 혈관내피세포, 골형성 세포, 신경세포, 성상세포, 지방세포, 연골형성 세포, 골형성 세포, 또는 인슐린 분비 체장 베타세포 등으로 분화하는 능력을 가지고 있어, 간경변, 골다공증, 골관절염, 신경 질환, 당뇨병 등의 치료에 효과적이고, 유방 조직 형성에 유용하다.

As described in detail in the above, the manufacturing method of the placental stem cell using the placenta tissue according to the present invention is useful in the breast tissue formation it is effective for the treatment of the cirrhosis of the liver, the osteoporosis, the osteoarthritis, the neural disease, the diabetes etc the stem cell is manufactured from the other organization it compares and more efficiently, it can produce and it has the capability in which the multipotent stem cells according to the present invention specializes in the myocyte, the blood vessel endothelial cell, the bony osteogenesis cell, the nerve cell, the astrocyte, the fat cell, the cartilage formatting cell, the bony osteogenesis cell or the insulin secretion pancreatic beta cell etc.

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

The specific part of the invention content 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 a person skilled in the art 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.

## 기술적 과제

## Technical Task

이에 본 발명자들은 다양한 조직에서 줄기세포를 제조하고자 예의 노력한 결과, 태반 조직을 이용하여 태반 줄기 세포를 제조하는 경우, 기존의 지방 조직을 이용하여 줄기세포를 제조하는 것과 비교해서, 이하와 같은 면역학적 더 효율적으로 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

Thus, in the inventors is the various organizations, it made many efforts in order to manufacture the stem cell. Then the placental stem cell the stem cell was manufactured using the placenta tissue in case manufacture using the existing adipose tissue it compared. It confirmed more efficiently, to could produce with the amyno logic like this and the invention was completed.

본 발명의 목적은 세절한 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor) 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 것을 특징으로 하는, (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성인 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 태반 줄기세포의 제조 방법 및 수득된 태반 줄기세포를 제공하는데 있다.

This Purpose of the invention represents (a) CD29, the CD44, the CD73, the CD90 and CD105, altogether, the immunological characteristic of the positivity which it collects after cultivating the amnion, sliced curtain, and the decidua basalis or the placenta tissue in the bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) contained culture medium. And the manufacturing method and the obtained placental stem cell of the placental stem cell having the capability which altogether shows the immunological characteristic of voice about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR it shows the immunological characteristic of the positivity about (b) Oct4 and SSEA4 it is adhered to (c) plastic and it grows and shows the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) and it forms the sphere at the SFM culture medium and specializes in (d) mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin. The long-term maintenance is possible through the undivided condition are to be provided.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 다능성 태반 줄기세포로부터 근세포, 신경세포, 골형성 세포, 지방조직세포, 연골 세포 및 췌장 베타세포로의 분화방법 및 상기 분화된 세포 또는 상기 태반 줄기세포를 함유하는 골관절염, 골다공증 및 당뇨병 등의 치료용 세포치료제와 유방 조직 형성용 세포 치료제를 제공하는데 있다.

It is still another object of the present invention to provide the cell therapy product for the cell therapy product for the treatment and breast tissue formation including the osteoarthritis, containing the differentiation method to the myocyte, the nerve cell, the bony osteogenesis cell, the adipose tissue cell, the cartilage cell and pancreatic beta cell and specialized cell as described above or the placental stem cell from the versatility placental stem cell the osteoporosis and diabetes etc.

## 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세절한 양막, 장막, 기저탈락막 또는 태반 조직을 콜라게나아제 및 bFGF 함유 배지에서 배양한 다음 회수하는 단계를 포함하는, (a) CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성인 면역학적 특성을 나타냄; (b) Oct4 및 SSEA4에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타냄; (c) 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타내고, SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능함; 및 (d) 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지는 특성을 나타내는 태반 줄기세포의 제조방법 및 이에 의해 수득되는 태반 줄기세포를 제공한다.

## Structure & Operation of the Invention

To accomplish the above objects, the invention provides the placental stem cell which is property having the capability which altogether shows the immunological characteristic of the positivity about (a) CD29, the CD44, the CD73, the CD90 and CD105 and it altogether shows the immunological characteristic of voice about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR it shows the immunological characteristic of the positivity about (b) Oct4 and SSEA4 it is adhered to (c) plastic and it grows and shows the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) and it forms the sphere at the SFM culture medium and specializes in (d) mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin. The long-term maintenance is possible through the undivided condition obtained with manufacturing method of the placental stem cell shown and this including the amnion, curtain, and the step that it collects after cultivating the decidua basalis or the placenta tissue in the collagenase and bFGF contained culture medium. The amnion slice.

또한, 상기의 수득된 태반 줄기 세포로부터, 근세포, 골형성 세포, 신경세포, 지방세포, 연골세포 또는 췌장 베타세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

Moreover, the method for letting differentiate as the myocyte, bony osteogenesis cell, nerve cell, fat cell, cartilage cell or the pancreatic beta cell is provided from the obtained placental stem cell described in the above.

또한, 본 발명은 상기의 수득된 태반 줄기 세포 또는 이로부터 분화된 세포를 유효 성분으로 함유하는 세포치료제를 제공한다.

Moreover, the present invention is to provide the cell therapy product containing the obtained placental stem cell described in the above or the cell specialized from this as an active ingredient.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

Hereinafter, the invention is particularly explained.

1. 용어의 정의

1. The definition of the term.

본 발명에서 사용된 용어 #39#태반 줄기세포#39#는 포배낭의 내부 세포 덩어리로부터 유도되지 않은 세포를 지칭한다. 태반으로부터 수득될 수 있는 줄기세포는 태반 줄기세포, 만능성 세포, 다능성 세포 및 수임 전구(progenitor) 세포를 포함한다.

In the present invention, the cell in which the used term ' placental stem cell ' is not induced from the inner cell mass of the blastula is named. The stem cell which can be obtained from the placenta comprises the placental stem cell, the versatility cell, and the pluripotent cell, and the acceptance of an appointment bulb (progenitor) cell.

본 발명에서 사용된 용어 #39#다능성 세포#39#는 포유류 신체의 약 260개 세포 유형의 임의의 하위세트로의 성장능력을 갖는 세포를 지칭한다. 만능성 세포와 달리, 다능성 세포는 모든 세포 유형을 형성하려는 능력을 갖지 않는다.

In the present invention, the cell having the used term ' pluripotent cell ' is the scalability to the arbitrary subset of 260 abouts the cell type of the mammalia body is named. It does not have the capability in which the pluripotent cell forms all cell types to the versatility cell.

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

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.

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.

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 ' transit ' ) cell. And thereafter it is mature of the organization and it is proliferated to the complete cell of the form.

본 발명에서 사용된 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다. 예를 들면, 개체발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리카락이나 뿔 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포라든가 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질적이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어져 있는 상태를 분화라고 한다.

In the present invention, it refers to that the form or the function is changed while so that the cell disrupts and deposits and the used term minute (differentiation) grows the phenomenon, that the structure or the function makes be special in other words, the cell of the creature, and the tissue equivalent perform the task which is given to each. Generally, relatively, the simple group is the other subsystem more than two it qualitatives should be the separated phenomenon. For example, in ontogeny, as the distinction including head or body etc. been generated in the at first time homogeneous between part which it knows which or the myocyte the distinction including the nerve cell etc. been generated in the cell the difference it qualitatives is nearly generated in the between part of any kind of primary kingdom that was the homogeneous at first time. Or the complicity in treason which it qualitatives it can distinguish as the result or the state divided into the subsystem is done as the differentiation.

본 발명에서 사용된 용어 #39#세포치료제#39#는 사람으로부터 분리, 배양 및 특수한 저장을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식·선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일

In the present invention, medical supplies used as the object of the treatment through a series of action of the etc. changed, and the diagnosis and prevention the biological property of the other method the cell it is used medical supplies (US Food and Drug Administration rules) in order to restore the function of the cell or the

련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품에 지칭한다. 세포치료제는 세포의 분화정도에 따라 크게 체세포치료제, 줄기세포치료제로 분류되며 본 발명은 특히 줄기세포치료제에 관한 것이다.

## 2. 태반 줄기세포의 분리 및 정제

태반(placenta)은 임신 중에 태아를 위해 만들어지는 것으로 무게 500g, 지름 15~20cm, 두께 2~3cm 정도의 원반 형태로 되어있다. 태반의 한쪽은 모체와 달라 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.

본 발명에 따른 인간 태반조직(human term placenta)에서 분리된 탈락막(decidua) 또는 양막(amnion) 유래 줄기세포는 성인의 자가성 성체줄기세포로 분류되고, 태반조직을 사용하므로 윤리적으로 문제가 되지 않는다.

통상 다음과 같은 방법을 통하여, 태반 조직으로부터 다능성 줄기세포를 분리 및 정제한다. 본 발명은 포유류의 태반, 바람직하게는 인간의 태반에 관한 것으로, 이는 자궁으로부터의 만출 후, 처리 및 배양되어 다능성 줄기세포, 태반 줄기세포 및 다른 생체 물질을 생성한다. 태반 줄기세포는 자궁으로부터 만출된 태반으로부터 수득된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 성장인자[예: bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) 및 EGF (Epidermal Growth Factor)]의 존재하에서 배양된다.

본 발명에서는 우선, 태반을 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산 분만에서 수집하고, 다음과 같은 방법을 통하여, 인간 태반 조직으로부터 다분화능 줄기세포를 분리 및 정제하였다.

인간 태반 조직샘플로부터 양막 및 탈락막을 분리하여 각각 PBS로 세척한다. 세척된 양막 및 탈락막 조직을 잘게 자른다. 잘게 자른 양막과 탈락막 조직은 100 ?? 디쉬로 옮긴후 콜라게나아제 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM (Dulbecco#39#s Modifi

organization are named as the object of the used term ' cell therapy product ' is the separation from human, the cell which cultivates and which is manufactured through the special authoring and organization the treatment, and the diagnosis and prevention. According to the cell therapy product is the differentiation degree of the cell, it is classified as the somatic cell therapeutic agent, and the stem cell therapeutic agent. And the invention relates to especially, the stem cell therapeutic agent.

## 2. The separation and refinement of the placental stem cell.

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. A 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.

The decidua (decidua) or the amnion originated stem cell separated from the human placenta organization (human term placenta) according to the present invention 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.

Generally, multipotent stem cells are refined through the method as follows from the placenta tissue with the separation. The invention relates to the placenta of the mammal, preferably, the placenta of human. And this is the processing after the expulsion, from the womb and multipotent stem cells it is cultivated, the placental stem cell, and other biomass are created. It is obtained from the placenta in which the placental stem cell is delivered from the womb. In a preferred embodiment, the placenta is cultivated under the presence of growth factor [the example: bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) and EGF (Epidermal Growth Factor)].

In the present invention, firstly, according to the Korea university hospital clinical test Ethics Advisory Board tutorial the placenta, the Korea university annex Kuro hospital collected in the eutocia and the premature birth childbirth. The Multipotent stem cell was refined through the method as follows from the human placenta tissue with the separation.

The amnion and decidua are separated from the human placenta tissue sample and decidua wash to the respective PBS. The amnion and the washed decidua organization are small pieces cut off. The amnion which it small

ed Eagle Medium, Gibco) 배지를 이용해 37°C에서 1시간 동안 화학적 분해 작업을 한다.

화학적 분해된 조직들을 100 $\mu$ m 메쉬(mesh)에 필터링하여 분해되지 않은 조직을 제거 후 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 배양한다. 이때, 중간엽 줄기세포의 경우는 바닥에 부착이 되고 이외의 세포들은 부유하여 있다.

이러한 줄기세포는 플라스틱에 부착되어 성장하며, 둥근형태(round-shape) 또는 선형태(spindle-shape)의 형태학적 특성을 나타낸다. 이들이 지난 후 디쉬 바닥에 붙지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 배지를 2~3일마다 교체하면서 배양하여 인간 태반에서 분리한 양막 또는 탈락막 유래 다분화능 줄기세포액을 수득하였다.

상기 분리된 태반 유래 다능성 줄기세포의 증식율을 조사하면, 계대수(passage number)가 12에 이르기까지, CPDL이 점진적으로 증가하여 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있다(도 11 및 12).

수득한 줄기세포는 SFM 배지에서 스피어(sphere)를 형성하여 미분화 상태로 장기간 유지가 가능하다(도 4). 본 발명에서 사용 가능한 SFM 배지의 하나로 10 #956#M, 1 x antibiotic antimycotic solution, 1 #956#g/ml hydrocortisone, 5 #956#g/ml Insuline, 20 ng/ml EGF, 40 ng/ml FGF, B27,  $\beta$ -mercaptoethanol을 함유하는 MEBM (Mammary Epithelial Basal Medium) 배지를 들 수 있다.

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.

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.

pieces cuts and decidua organization is 100.

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 the single cells it cultivates in the DMEM medium in which the bFGF is contained. At this time, in case of the mesenchyme stem cell, it is adhered to the bottom surface and the cell of the excepts are wealthy.

This stem cell exhibits the morphology of the rounded shape (round-shape) or the line style (spindle-shape) it is adhered to plastic. 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 amnion or the decidua originated Multipotent stem cell liquid separated from the human placenta was obtained.

If the breeding ratio of the separated placenta originated multipotent stem cells as described above is irradiated until the passage number tells to 12 it can know CPDL gradually increasing and having the excellent breeding ratio (figures 11 and 12).

The obtained stem cell forms the sphere at the SFM culture medium and the long-term maintenance is possible through the undivided condition (fig. 4). In the present invention, the MEBM (Mammary Epithelial Basal Medium) culture medium containing 10  $\mu$ M, 1 x antibiotic antimycotic solution, 1  $\mu$ g / ml hydrocortisone, 5  $\mu$ g / ml Insuline, 20 ng / ml EGF, 40 ng / ml FGF, B27,  $\beta$ -mercaptoethanol can be given about one of the usable SFM culture medium.

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 by experiencing like PCR and gene expression profiling and measuring the change at the gene expression using the technology which is known to have the well in field the change can be monitored at the easily.

In a preferred embodiment, the cell cultivated in the placenta experiences and it experiences 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 classifying method which is known in field.

일례로, 수득한 태반 유래 줄기세포액으로부터 목적의 표면항원을 발현하고 있는 다능성 줄기세포를 수득하는 방법으로서는 소팅 기능을 가진 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법(Int. Immunol., 10(3):275, 1998), 자기 비즈를 사용하는 방법, 다능성 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법(J. Immunol., 141(8):2797, 1998) 등이 있다. 또한, 대량의 배양액 등으로부터 다능성 줄기세포를 수득하는 방법으로서, 세포의 표면에 발현되어 분자(이하, 표면 항원이라 칭함)를 특이적으로 인식하는 항체를 단독 또는 조합하여 이를 칼럼으로서 사용하는 방법이 있다.

플로우 사이토미터 소팅 방식으로서, 수직하전 방식, 셀캡처 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 결합 능력에 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.

본 발명에서 사용 가능한 하나의 방법인 플로우 사이토미터를 사용한 FACS 법으로서, 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.

### 3. 태반으로부터 수득된 태반 줄기세포의 특성

태반으로부터 단리된 줄기세포는 균질하고 열균성이다. 또한, 줄기세포는 인간에게 투여되기 적합한 형태(즉, 약학적 등급)로 용이하게 수득된다.

For example, it has the flow cytometer having sorting function the method using the FACS method (Int. immunol, 10 (3) :275, 1998), magnetism biz used, the paning (J using the antibody which specifically recognize s clearly multipotent stem cells. Immunol, 141 (8) :2797, 1998) etc. as the method of obtaining multipotent stem cells which are revealed the surface antigen of the purpose from the obtained placenta originated stem cell liquid. Moreover, as the method of obtaining the multipotent stem cells including the culture fluid of bulk etc, it has the method of using as the column the singleness or this the antibody which specifically recognizes clearly it assembles.

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 corporate 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.

In the present invention, as usable one method the FACS method using the 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.

### 3. The property of the placental stem cell obtained from the placenta.

The isolated stem cell from the placenta may be the bactericidal activity it homogenizes. Moreover, the easily is obtained by the suitable form (in other words, the pharmaceutical grade) that it prescribes the stem cell for human.

장기간 배양 후 세포들을 표면 CD 시리즈 항원 마커들, 예를 들어 CD29 (mononuclear cell marker), CD31(endothelial cell and stem cell marker), CD34, CD44(hematopoietic cell marker), CD90(mononuclear stem cell marker), CD73(T-cell and B-cell marker) CD105(endothelial cell marker), CD45(hematopoietic cell marker), 들로 캐릭터라이제이션하여 FACS 분석에 적용할 수 있다.

본 발명의 방법에 의해 수득된 바람직한 태반 줄기세포는 하기 세포 표면 표지의 존재에 의해 규명될 수 있다: CD29, CD44, CD54, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성인 면역학적 특성을 나타낸다. 이러한 세포 표면 표지는 당해 분야에 익히 공지된 방법에 따라, 예를 들어 유세포분석기에 의해 일괄적으로 측정된 후 세척하고, 항-세포 표면 표지 항체로 착색된다.

또한, 본 발명의 태반 줄기세포는 미분화상태의 세포 마커라고 할 수 있는 Oct4 또는 SSEA4의 마커를 이용하여 확인할 수 있다(도 9). Oct4는 줄기세포에서 미분화상태 표지인자로써 잘 알려져 있고, 기술분야에서는 대한민국특허출원 제10-2004-0105716호 "인간 배아줄기세포에 특이적인 단일클론항체", 대한민국특허출원 제10-2004-0096780호 "포유류 배아 및 줄기세포의 미분화 상태 유지 Oct4 유전자 발현 억제용 이중 나선 RNA", 대한민국특허출원 제10-2006-0092128호 "파골 세포 기반 적소 유사 구조에 의해 증식능이 증가된 인간 제대혈 유래 다분화능 줄기 세포 및 그 제조방법" 등에서 나타난 바와 같이, 미분화상태의 줄기세포임을 입증하기 위한 실험으로 Oct4 발현능 실험을 하는 것이 통상이다. 또한, SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4)가 인간 배아줄기세포의 표면에 존재한다는 것도 당업자에게 이미 알려져있는 사실이다.

Oct4 및 SSEA4의 발현은 RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 이용한다. RT-PCR의 방법은 당분야에 공지되어 있는 기술이다. RT-PCR은 특정 부위의 RNA를 주형(template)로 하여 이에 상응하는 cDNA를 합성한 다음, 이를 이용하여 PCR 증폭을 시행하는 기술이며, 실험과정은 (1) 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 RNA로부터 cDNA를 제조하는 과정과 (2) cDNA를 이용하여 특정부위를 증폭시키는 과정으로 이루어지며 (2) 과정은 게놈(genomic) DNA로부터 특정 유전자 부위를 증폭시키는 방법과 같다. 이 방법은 노던 블롯 하이브리다이제이션과 같은 방법을 통해 가능하던 RNA 분석보다 실험방법이 더욱 간단할 뿐만 아니라, 유전자의 염기서열 결정이 가능하기 때문에 주로 mRNA의 염기서열 및 전사량을 연구할 때 크게 도움이 되는 기술이다.

본 발명의 태반 줄기세포는 Oct4와 SSEA4의 발현에 대해 양성 반응을 나타낸다(도 9).

Caricaturize and cells can be applied to the FACS analysis after the long term culture with surface CD series antigen marker for example the CD29 (mononuclear cell marker), CD 31 (endothelial cell and stem cell marker), CD34, the CD 44 (hematopoietic cell marker), the CD 90 (mononuclear stem cell marker), CD 73 (T-cell and B-cell marker) CD 105 (endothelial cell marker), the CD 45 (hematopoietic cell marker).

The placental stem cell done with desirable obtained with the method of the present invention can be examined by the presence of below cell-surface mark closely: the immunological characteristic of the positivity is altogether shown about the CD29, CD44, CD54, CD73, CD90 and CD105. The immunological characteristic of voice is altogether shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR. After this cell-surface mark experiencing and being summarily measured by for example, the Flow Cytometer according to the method which is known to have the proficiently in field it washes. It is colored to the anti-cell surface antibody-enzyme conjugate.

Moreover, it can confirm using the marker of the Oct4 which the placental stem cell of the present invention can be called the cell marker of the undivided condition or the SSEA4 (fig. 9). The Oct4 may be ordinarily, it shows up in the human umbilical blood originated Multipotent stem cell with an increased monoclonal antibody specific for KR10-2004-0105716 A human embryonic stem cell in the technical field, the double stranded RNA for the undivided condition maintenance Oct4 gene silencing of KR10-2004-0096780 A mammal germ and stem cell, and the reproductive integrity by KR10-2006-0092128 A osteoclast base right place analogous structures it is well known in the stem cell as the undivided condition marker and manufacturing method thereof etc. Moreover, it is the fact that is already known to the person skilled in the art that the SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4) exists on the surface of the human embryonic stem cell.

The expression of the SSEA4 and Oct4 may be formed of the RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). It is the technology in which the method of the RT-PCR is known to have in the relevant field. The test process it is the technology implementing the PCR amplification using this RNA is to the mold (template) and the corresponding cDNA is thus synthesized of the RT-PCR is the specific site are same as those of a process of manufacturing the cDNA from RNA using (1) reverse transcriptase and process of amplifying the specific site using (2) cDNA the method of amplifying the process is the specific gene region from the genome (genomic) DNA it is made (2). Mainly, the base sequence and transfer amount of the mRNA the sequencing of the gene is possible the experimental method is more simple than the RNA analysis of being possible through the method like the blot hybridization in which this method plays may be referred to the technology which is helpful when conducting researches.

The placental stem cell of the present invention exhibits the positive reaction about the expression of the Oct4 and SSEA4 (fig. 9).

#### 4. 태반 줄기세포의 분화

본 발명의 방법에 의해 수득된 태반 줄기세포는 중배엽, 내배엽 및 외배엽 유래 세포로 분화하는 능력을 가지고 있다. 지방세포 분화, 연골세포 분화, 골아세포 분화, 조혈세포 분화, 근세포 분화, 혈관세포 분화, 신경세포 분화, 간세포 분화를 비롯한, 특정 세포 계통을 따라 분화하도록 유도될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 수득된 태반 줄기세포는 이식 및 생체의 처리 프로토콜에서의 사용을 위해 분화하도록 유도된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 수득된 태반 줄기세포는 특정 세포 유형으로 분화하도록 유도되고 치유 유전자 생성물을 제공하도록 유전자적으로 설계된다.

특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 의해 수득된 태반 줄기세포는 분화하도록 유도되는 생체의 화합물과 함께 항온 처리된 후 분화된 세포는 실험대상으로 직접 이식된다. 따라서, 본 발명은 표준 배양 매지를 사용하여 인간 태반 줄기세포를 분화시키는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 다능성 태반 줄기세포는 근세포, 신경세포, 성상세포, 골형성세포, 연골세포, 지방세포 및 인슐린 분비 체장 베타세포로 분화시키는 방법을 포함한다.

줄기세포의 특정 세포 유형으로의 분화 측정은 당해 분야에 익히 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 예를 들어, (1) 태반 줄기세포를 하루 동안 아자사이티딘(azacytidine)을 전처리한 후 SKBM 배지(cambrex, co.)에서 근세포로의 분화를 유도할 수 있고, (2) 태반 줄기세포를 BME (beta-mercaptoethanol) 및 FBS(Fetal Bovine Serum)를 함유한 DMEM 배지에 전배양 하고, 상기 전배양액을 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 및 BHA(Butylated hydroxyanisole)로 처리하여 신경분화를 유도할 수 있고, (3) 태반줄기세포를 TCP(Tricalcium phosphate)와 혼합하여 이소이식하여 골형성 세포로 분화시킬 수 있고, (4) 태반 줄기세포를 덱사메타손(dexamethasone), 인도메타신 (indomethacin), 인슐린 및 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)를 함유한  $\alpha$ -MEM배지에 배양하여 지방세포로 분화시킬 수 있다.

또한, 상기 분화들은 유세포 분석 또는 면역세포화학과 같은 기법을 사용하여 세포 표면 표지(예를 들어 조직-특이적 또는 세포-표지 특이적 항체로 세포를 염색함) 및 형태의 변화를 측정하면서, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하여 세포의 형태를 조사함으로써, 또는 PCR 및 유전자-발현 프로파일과 같은 당해 분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.

#### 6. 태반 줄기세포 및 이의 분화세포의 이용

#### 4. The differentiation of the placental stem cell.

The placental stem cell obtained with the method of the present invention has the capability specializing in the mesoderm, and the endoderm and ectoderm cellular origin. It can be induced in order to specialize along the specific cell lineage including the inhibitory effects on adipocytes, the chondrogenesis, the osteoblast differentiation, the hemopoietic cell differentiation, the myocyte differentiation, the blood vessel cell differentiation, the neural cell differentiation, including the interstitial cell differentiation. In the specific embodiment, it is induced so that the placental stem cell obtained according to the method of the present invention specialize for the use at the transplant and ex vivo treatment protocol. In the specific embodiment, it is induced so that the placental stem cell obtained according to the method of the present invention specialize in the specific cell type and in order to provide the healing gene product it is designed to the gene.

In the specific embodiment, the cell which is specialized after being treated with constant temperature with vitro compound which is induced so that the placental stem cell obtained with the method of the present invention be specialized is directly transplanted to the test objects. Therefore, the invention comprises the method of letting differentiate the human placental stem cell using the type culture land for sale. Therefore, the versatility placental stem cell according to the present invention comprises the myocyte, the nerve cell, the astrocyte, the bony osteogenesis cell, the cartilage cell, the fat cell and the method for letting differentiate as the insulin secretion pancreatic beta cell.

It cultivates in DMEM medium containing the BME (beta-mercaptoethanol) (2) placental stem cell the differentiation measurement to the specific cell type of the stem cell experiences and it can be performed with the method which is known to have the proficiently in field and the FBS (Fetal Bovine Serum) in  $\alpha$ -MEM culture medium containing the dexamethasone (4) placental stem cell, the indomethacin, and insulin it mixes and IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) and it can let differentiate as the fat cell.

Moreover, while differentiations measure the change of the form and cell-surface mark (the cell is dyed to the tissue-specific or the cell-cover specific antibody for example) using the technique such as the flowcytometry and immunocytochemistry the form of the cell is irradiated using the optical microscope or the confocal microscope. In that way by experiencing like PCR and gene-expression profile and measuring the change on the gene expression using the technique which is known to have the proficiently in field the change can be confirmed.

#### 6. The usage of its differentiated cell and placental

stem cell.

본 발명의 태반 줄기세포는, 신체의 조직 또는 기관이 목적하는 세포 군집, 예를 들어 줄기세포 또는 유래세포군집의 생착, 이식 또는 주입에 의해 강화, 치료 또는 대체되는 다양한 종류의 치료 프로토콜에 사용될 수 있다. 상기 본 발명의 태반 줄기세포는 존재하는 조직을 대체 또는 강화시켜, 새롭거나 변화된 조직이 되게 하거나 생물학적 조직 또는 구조와 결합시킬 수 있다. 또한, 전형적으로 배아 줄기세포가 사용되는 치료 프로토콜에서 배아 줄기세포는 본 발명의 태반 줄기세포로 대체될 수 있다. 일례로, 본 발명의 태반 줄기세포 또는 이의 분화된 세포를 함유하는 알츠하이머, 파킨슨씨 병 등의 신경질환, 진행성 근이영양증, 루게릭 병 등의 근질환, 골관절염, 골다공증의 골질환 및 당뇨병 등의 치료용 세포치료제와 유방 조직 형성용 세포 치료제 등에 사용될 수 있다.

The placental stem cell of the present invention, is the organization of body or the boiler may be used in the intended the cell colony, for example, the engraft of the stem cell or the cellular origin population, the strengthening by the transplant or injection, and the therapy protocol of the treatment or the replaced various kind. Or the organization in which the placental stem cell of the present invention exists is strengthened in the world. It becomes the organization new or changed or it can bind with the biological tissue or the structure. Moreover, the embryonic stem cell can be replaced with the placental stem cell of the present invention in the therapy protocol in which the embryonic stem cell is typically used. For example, it can be used for the Alzheimer, containing the placental stem cell of the present invention or the specialized cell the parkinsonism, including, the neural disease, the muscular dystrophy, the amyotrophic lateral sclerosis, including, the myopathy, the osteoarthritis, the osteoporosis and diabetes of the osteoporosis, including, the cell therapy product for the cell therapy product for the treatment and breast tissue formation etc.

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 태반으로부터의 태반 줄기세포 및 기타 줄기세포는 적합 및 부적합 HLA형조혈 이식을 포함하는, 자가 및 동종 조혈 이식에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 태반 줄기세포는 치료학적 이식 프로토콜, 예를 들어 간, 췌장, 신장, 폐, 신경계, 근육계, 뼈, 골수, 흉선, 비장, 점막 조직, 생식선 또는 모발의 줄기세포 또는 유래세포를 강화 또는 대체시키는데 사용될 수 있다.

It can be used for self including the other stem cell is conformity and the nonconformity HLA Ministry of Justice blood transplant and allogenic hematopoiesis transplant of the invention. For example, the placental stem cell of the present invention replaces the therapeutics transplant protocol, for example, the stem cell of the liver, pancreas, extension, lungs, nervous system, muscular system, bone, bone marrow, thymus, spleen, telasubmucosa, germline or the hair or the cellular origin as the strengthening but it can be used.

태반 줄기세포는, 전형적으로 유래세포가 사용되는 치료 또는 연구 프로토콜에서 특정한 부류의 전구세포 (예를 들어, 연골세포, 줄기세포, 조혈세포, 췌장 실질세포, 신경줄기세포 및 근육 유래세포 등) 대신 사용될 수 있다.

The placental stem cell can be instead of used in the treatment or the study protocol in which the cellular origin is typically used with precursor cell (for example, the cartilage cell, stem cell, hemopoietic cell, pancreas parenchymal cell, neural stem cell and muscle cellular origin etc) of the specific class.

본 발명의 태반 줄기세포는 연골, 건 또는 인대의 강화, 치료 또는 대체에 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서는, 인공보철물(예를 들어, 둔부 인공보철물)이 본 발명의 태반 줄기세포로부터 성장한 대체 연골조직 구조물로 피복된다. 다른 실시양태에서는, 관절(예를 들어, 무릎)이 태반 줄기세포로부터 성장한 연골조직 구조물로 재구성된다. 또한, 연골조직 구조물은 주로 상이한 유형의 관절의 재구성 수술에 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Resnick, D. *et al*, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2d, 1988]에서의 프로토콜).

The placental stem cell of the present invention can be used for the cartilage, the strengthening of gun or the ligament, and the treatment or the substitution. For example, in the specific embodiment, it is coated with the cartilage tissue structure in which the prosthesis (for example, the buttock prosthesis) grows from the placental stem cell of the present invention. In the other embodiment, the joint (for example, the knee) is re-organized to the cartilage tissue structure growing from the placental stem cell. Moreover, the cartilage tissue structure can be mainly used for the reconfiguration operation of the different joint of the type (for example, the protocol at literature [Resnick, D. (I)et al, (/I) Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2d, 1988]).

본 발명의 태반 줄기세포는 질병으로부터 야기된 조직 및 기관의 손상을 복구하는데 사용될 수 있다. 이러한 실시양태에서는, 환자에게 태반 줄기세포가 투여되어 질병의 결과로서 손상된 조직 또는 기관을 재생 또는 회복시킬 수 있다(예를 들어, 화학요법 또는 방사선 이후의 면역을 향상시키고, 심근경색 이후의 심장조직을 복구한다).

The damage of the boiler and the organization in which the placental stem cell of the present invention is caused from the disease is restored but the damage can be used. In this embodiment, it prescribes the placental stem cell for the patient and the organization or the boiler damaged as the result of the disease can be made turn around as regeneration (for example, the immune system).

stem of the chemical therapy or the radiation after is improved. The immune system is restored the heart tissue of the myocardial infarction this after).

또한 본 발명의 태반 줄기세포는 주사가능물질(예를 들어, 본원의 참조문헌으로 인용되는 국제특허 공개공보 제 WO 96/39101 호)로서 제형화될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포 및 조직은 미국특허 제 5,709,854 호; 제 5,516,532 호; 제 5,654,381 호(모두 본원의 참조문헌으로 인용됨)에 기술된 바와 같은 중합성 또는 가교성 하이드로겔을 사용하여 제형화될 수 있다

Moreover, the placental stem cell of the present invention can be formulated as the injectable material (WO WO96/39101 A cited due to for example, the reference literature of the present application). In the other embodiment, it can be formulated using polymerization or the crosslinking hydro gel in which cell and organization of the present invention are described in (5,516,532): US5,654,381 A (it is altogether cited due to the reference literature of the present application).

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.

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

**실시예 1: 태반 조직의 준비 및 분리**

**embodiment 1: the preparation and separation of the placenta tissue.**

태반은 고려대학교병원 임상시험윤리위원회지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상 분만과 조산분만에서 수집되어 연구용으로 사용하였다. 태반 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수에 넣어서 연구실까지 옮겼다.

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

연구실로 옮긴 태반 조직은 PBS를 이용하여 세척하여 혈구세포들과 여러 조직의 잔해들을 제거하거나 조직을 용혈버퍼(hemolysis buffer)를 이용하여 혈구세포들을 제거하거나 태반을 구성하고 있는 양막(amnion), 장막(chorion), 기저탈락막(decidua) 및 태반(placenta bad)조직을 각각 포셋을 이용하여 조심스럽게 분리하였다.

The amnion, which organized the placenta whether the placenta tissue which went to the laboratory washed using PBS and it removed the debris of the different organization and blood cells or it removed blood cells tissue using the hemolysis buffer the curtain (chorion), and the decidua basalis and placenta (placenta bad) organization were carefully separated using the respective posset.

**실시예 2: 태반 유래 줄기세포의 분리 및 배양**

**embodiment 2: the separation and cultivation of the placenta originated stem cell.**

분리된 각각의 조직들은 100 $\mu$  디쉬에 놓고 멸균된 메쉬를 이용해 1~2mm 크기로 잘게 세절하였다. 그 후, 콜라게나제가 포함된 배지에 놓고 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 최소 1 시간에서 최대 4시간 동안 반응시킨 다음 100 와이어 직물체를 이용해 콜라게나제가 처리된 조직을 걸렀다. 이렇게 분리한 세포들은 100 mm 디쉬에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하 DMEM배지에서 배양하였다.

It using the sterilized mesh separated each organizations place on 100  $\mu$  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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> under condition DMEM medium.

**비교예 1: 태반 조직 및 지방 조직 유래 줄기세포 배양 효율 비교**

**comparative example 1: the placenta tissue and adipose tissue-originated stem cell culture efficiency comparison.**

5g의 지방 조직으로부터 줄기세포를 분리, 배양할 경우 두 번의 계대 배양 후 천만개 이상의 세포를 획득할 수 있었으나 약 3g의 태반 조직의 경우 최초의 계대 배양 후 천만개 이상의 세포를 획득할 수 있었다. 이를 통해, 태반 조직을 이용하여 줄기세포를 배양하는 경우, 기존의 지방 조직을 이용하여 줄기세포를 배양하는 경우보다 훨씬 효율적인 것을 알 수 있었다.

The stem cell was separated from the adipose tissue of 5g. In case of cultivating the ten million or more the cells could be obtained after two subcultures but the ten million or more the cells could be obtained in case of the placenta tissue of about 3g after the initial subculture. Through this, it is seen that it is more efficient than

the case of cultivating the trunk cell using the placenta tissue, and the case of cultivating the trunk cell using the existing adipose tissue.

**실시예 3: 태반조직 유래 줄기세포의 증식율 조사**

**embodiment 3: the breeding ratio investigation of the placenta tissue originated stem cell.**

상기 분리된 인간 태반 조직 유래 다능성 줄기세포의 증식방법에 따라 수득된 줄기세포의 증식율을 조사하였다. 각각 다른 인간 개체의 태반조직 샘플로부터 가져온 태반 줄기세포를 실시예 1 내지 3과 같은 분리방법을 거쳐 얻은 후, 75-flask에 2×10<sup>5</sup>씩 씨딩(seeding)하였다.

The breeding ratio of the stem cell obtained according to the propagating method of the separated human placenta origin of organization multipotent stem cells as described above was irradiated. After the placental stem cell brought was obtained from the placenta tissue sample of the respective other human individual after the separation method like the embodiments 1 through 3 it did 75-flask with 2 × 10<sup>5</sup> seeding (seeding).

CPDL(cumulative population doubling level)은 세포의 증식율을 나타내는 지수로서,

It is the index in which the CPDL (cumulative population doubling level) shows the breeding ratio of the cell.

CPDL=ln(Nf/Ni)/ln2

CPDL=ln(Nf/Ni)/ln2

(Ni=초기 seeding한 세포수, Nf=최종 세포수)

(the Ni= initial seeding one cell number, and the Nf= final cell number)

의 식으로 나타낼 수 있다.

It can show in terms of the consciousness.

기저탈락막 유래 줄기세포 및 양막 유래 줄기세포의 CPDL을 계대수(passage number)에 따라 관찰한 결과 계대수가 12일 때 약 30에 달하는 CPDL 값을 나타낸다 (도 11 및 12). 이러한 CPDL 값은 인간 지방 조직 유래 줄기세포( Lin et al., stem cells and development, 14: 92, 2005; Zuk et al., Tissue eng., 7: 211, 2001)의 그 값과 유사하며 이 결과로부터 본 발명에 따른 성체 줄기세포는 증식율이 매우 우수하다는 것을 알 수 있었다.

As a result of observing CPDL of the amnion originated stem cell and decidua basalis originated stem cell according to the passage number when the passage number is 12 the CPDL value which the number mounts up to about 30 is shown (figures 11 and 12). This CPDL value is similar to the value of human adipose tissue-originated stem cell (Lin et al., stem cells and development, 14: 92, 2005; Zuk et al., Tissue eng., 7: 211, 2001). And it could know from this result that as to the adult stem cell according to the present invention, the breeding ratio was very excellent.

**실시예 4: 태반 유래 다능성 줄기세포의 면역학적 특성**

**embodiment 4: the immunological characteristic of the placenta originated multipotent stem cells.**

실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 5% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 샘플수 만큼 1×10<sup>5</sup> cell을 분주하였다. 각 웰(well)에 항체(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 얼음에 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 다시 한번, 상기 상층액 제거 후 PBS로 세척하고 1000rpm에서 5분 동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 1% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)을 넣어서 싱글(single)화 하고, 플로우 사이토미터를 이용해 분석하였다. 그 결과, 아래에 표 1에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 태반조직 유래 태반 줄기세포는 CD29, CD44, CD73, CD90 및 CD105에 대하여 모두 양성의 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타냄을 알 수 있었다.

The placenta tissue originated multipotent stem cells obtained in the embodiment 3 was washed to PBS. After trypsinizing the cell was taken away and it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes. After throwing the supernatant away the mixed solution of PBS and 5% FBS was filled and the mixed solution centrifuged at 1000rpm after doing washing for 5 minutes. After throwing the supernatant away the cell was floated in PBS and it was 1 × 10<sup>5</sup> cell busy as the sample number. The antibody (R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) was put into each well. It incubated in ice for 40 minutes. It centrifuged at 1000rpm after incubation for 5 minutes. After removing the supernatant it washed to PBS and it centrifuged at 1000rpm for 5 minutes. Again, it washed to PBS and the process of centrifuging was repeated after the supernatant removal in 1000rpm for 5 minutes. Using the single and flow cytometer 1% paraformaldehyde is put after removing the supernatant, it analyzed. Consequently, the placenta tissue originated placental stem cell of the present invention on it beneath shows up in the table 1 represents the CD29, the CD44, the CD73, the CD90 and CD105, altoget

ther, the immunological characteristic of the positivity. And it could know the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR to altogether show the immunological characteristic of voice.

**태반유래 줄기세포의 표면항원분석(FACS analysis)**

Antigen	AD-MSCs
CD29	+
CD31	-
CD44	+
CD90	+
CD105	+
CD34	-
CD45	-
CD73	+
CD34	-
HLA-DR	-

**The surface antigen analysis of the placenta originated stem cell (FACS analysis)**

Antigen	AD-MSCs
CD29	+
CD31	-
CD44	+
CD90	+
CD105	+
CD34	-
CD45	-
CD73	+
CD34	-
HLA-DR	-

**실시예 5: 태반 유래 다능성 줄기세포의 Oct4 및 SSEA 발현 분석**

상기 실시예 3에서 수득된 태반 유래 줄기세포를 PBS로 세 번 세척하고, 4% paraformaldehyde을 함유한 PBS로 30분간 고정하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 0.1% Triton-X100을 함유한 PBS로 10분간 침투(permeabilization)시킨다. PBS로 세 번 세척한 후, Blocking buffer (5% goat serum)를 처리하여 4 ℃에서 한 시간 동안 반응시키고, 일차항체를 함유한 Blocking buffer에 하룻밤동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 이차항체로 암실에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후, mounting하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 분화능 줄기세포는 인간 배아 줄기세포의 마커인 Oct4와 SSEA에 대하여 양성반응을 나타내었다(도 10).

**embodiment 5: the Oct4 and SSEA expression analysis of the placenta originated multipotent stem cells.**

The obtained placenta originated stem cell was washed in the embodiment 3 to PBS with the Severn. It fixed on 30 min. to PBS containing 4% paraformaldehyde. 0.1% Triton-X100 is forced in PBS after doing the Severn washing through PBS contained with for 10 minutes penetration (permeabilization). The Blocking buffer (5% goat serum) is processed as PBS after doing the Severn washing and it reacts at 4 ℃ for the one-hour. It reacts in the Blocking buffer containing the primary antibody for one night. It washed to PBS with 3 time. It reacted in the dark room by the second antibody for 1 hour. PBS should be the mounting after doing the Severn washing. Consequently, as shown in figure 9, the blastogenesis stem cell according to the present invention exhibits the positive reaction about the Oct4 and SSEA which are the marker of the human embryonic stem cell (fig. 10).

또한, RT-PCR을 이용하여 Oct4의 발현을 확인하였다, RT-반응은 37℃에서 50분간, 70℃에서 10분간 행하였으며, PCR-반응은 95℃에서 5분간, 그리고 95℃에서 30초/ 58℃에서 40초/72℃에서 1분으로 40회의 사이클(cycles)을 행한 후, 72℃에서 10분간 수행하였다. 그 결과, 도 9에 나타나 있는 것처럼 기저탈락막 유래 줄기세포 및 양막 유래 줄기세포의 경우 800bp에서 발현되어 있음을 확인할 수 있었다.

Moreover, the expression of the Oct4 was confirmed using the RT-PCR. The RT- reaction performed in 37℃ in for 50 minutes, and 70℃. And the PCR- reaction performed the cycle (cycles) of 40 time in 95℃ in for 5 minutes and 95℃ in 30 second / 58℃ in 40 second / 72℃ to 1 minutes after doing the row in 72℃ with for 10 minutes. Consequently, as it showed up in fig. 9 it could confirm in case of the decidua basalis originated stem cell and amnion originated stem cell to be revealed in 800bp.

**실시예 6: 태반조직 다능성 줄기세포의 근세포로의 분화**

실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 10 ng/ml 피브로넥틴(fibronectin)이 코팅되어 있는 플라스크에 분주한 후 10 μM 5#39#-아자사이티딘(azacytidine)을 이용하여 24시간 동안 전처리를 한다. 전처리 후 SKBM 배지(Cambrex, Co.)를 이용하여 10 일 동안 배양한 후 면역 염색을 실시하였다.

**embodiment 6: the differentiation of the modern times captive of the placenta tissue multipotent stem cells.**

After being busy in the flask in which 10 ng / ml fibronectin is the obtained placenta tissue originated multipotent stem cells coated in the embodiment 3 it pre-processes using 10 μM 5'- azacytidine for 24 hours. The immunostaining was performed after the preprocessing using the SKBM culture medium (Cambrex, Co.) for 10 after doing cultivation.

그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포는 근세포의 특이항원인 미오신에 대하여 양성반응을 나타냈

Consequently, the human placenta origin of organization multipotent stem cells according to the pr

다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포가 근육세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다

#### 실시예 7: 태반조직 다능성 줄기세포의 신경세포로의 분화

실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 1mM BME 및 10% FBS 를 첨가한 DMEM 배지를 사용해 1일 동안 전배양(preincubation)하였다. 전배양 후 1% DMSO 및 100 #956#M BHA를 함유한 신경세포 분화 유도 배지에서 신경세포로의 분화를 유도하였다. 신경분화유도 배지를 첨가하고 9일 후, 면역염색을 실시하였다.

그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포는 신경계 정상세포의 특이항원인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 대하여 양성반응을 나타냈다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 인간 태반조직 유래 다능성 줄기세포가 신경세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 6).

#### 실시예 8: 태반 유래 다능성 줄기세포의 골형성 세포로의 분화

실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 태반 줄기세포를 골형성 유도 배지 (0.1  $\mu$ mol/L dexamethasone, 0.05 mmol/L ascorbic acid-2-phosphate, 및 10 mmol/L beta-glycophosphate, 5 ~ 30 % 인간 혈청 또는 플라즈마)에 희석하여 세포수를 센 다음, 플라스크에서 배양 (5% CO<sub>2</sub>, 37, 배지는 3 ~ 4일에 한번씩 교체)하여 골형성 세포로 분화를 유도하였다. 배양 시작 후 14일때 Alizalin red S 염색법을 이용하여 태반 유래 다능성 줄기세포가 골형성 세포로 분화되었음을 확인하였다. (도 7).

#### 실시예 9: 태반조직 다능성 줄기세포의 지방세포로의 분화

실시예 3에서 수득한 태반조직 유래 다능성 줄기세포를 5% FBS, 1#956#M Dexamethasone, 200#956#M Indomethacin, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l Insulin, 0.5mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)을 함유한  $\alpha$ -MEM 배지에서 2주 동안 배양하여 다능성 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 인간 태반 조직 유래 다능성 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다(도 8).

#### 도면에 대한 간단한 설명

esent invention exhibits the positive reaction about the myosin called the special antigen of the muscular cell. It could confirm from this result that the human placenta a origin of organization multipotent stem cells according to the present invention was specialized to the muscular cell.

embodiment 7: the differentiation to the nerve cell of the placenta tissue multipotent stem cells.

Using DMEM medium with 1mM BME and 10% FBS the placenta tissue originated multipotent stem cells obtained in the embodiment 3, it did for 1 with the pre-cultivation (preincubation). In the nerve cell differentiation medium containing 1% DMSO after the pre-cultivation and 100 $\mu$ M BHA, the differentiation to the nerve cell was induced. The neuronal differentiation inducing medium was added and the immunostaining was performed after 9.

Consequently, the human placenta origin of organization multipotent stem cells according to the present invention exhibits the positive reaction about the GFAP (glial fibrillary acidic protein) called the special antigen of the nervous system astrocyte. It could confirm from this result that the human placenta origin of organization multipotent stem cells according to the present invention was specialized to the nerve cell (fig. 6).

embodiment 8: the differentiation to the bony osteogenesis cell of the placenta originated multipotent stem cells.

After the obtained placenta tissue originated placental stem cell was diluted in osteoconduction culture mediums (0.1  $\mu$ mol / L dexamethasone, 0.05 mmol / L ascorbic acid-2-phosphate and 10 mmol / L beta-glycophosphate, 5 ~ 30 % human serum or plasma) and the cell number was counted in the embodiment 3 it played in the flask with cultivations (5% CO<sub>2</sub>, 37, and the culture medium is the single replacement in 3 ~4) and the differentiation was induced to the bony osteogenesis cell. When being 14 it confirmed after the culture start that the placenta originated multipotent stem cells was specialized using the Alizalin red S dyeing method to the bony osteogenesis cell. (fig. 7).

embodiment 9: the differentiation to the fat cell of the placenta tissue multipotent stem cells.

The placenta tissue originated multipotent stem cells obtained in the embodiment 3 was cultivated in a  $\alpha$ -MEM culture medium containing 5% FBS, 1 $\mu$ M Dexamethasone, 200 $\mu$ M Indomethacin, 10 $\mu$ g /  $\mu$ l Insulin, 0.5mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) for 2 weeks and the differentiation to the fat cell of the multipotent stem cells was induced. It analyzed using the Oil red O dyeing method. Consequently, it could confirm that the human placenta origin of organization multipotent stem cells according to the present invention was specialized to the fat cell (fig. 8).

#### Brief explanation of the drawing

도 1은 태반 유래 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 형태(morphology)에 대한 현미경 사진이다.

도 2는 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 기저탈락막 유래 MSC의 표면항원들을 분석한 결과이다.

도 3은 유세포 분석기(FACS)를 이용하여 양막 유래 MSC의 표면항원들을 분석한 결과이다.

도 4의 A는 SFM배지에서 3일간 배양한 1계대째 양막의 스피어 형성사진이고, B는 SFM배지에서 7일간 배양한 1계대째 기저탈락막의 스피어 형성사진이다.

도 5는 근세포로의 분화(Myogenesis)에 있어서, MM-3160 배지(근육세포 분화용 배지)에서 10일간 유도한 양막(A) 및 기저탈락막(B) 유래 줄기세포에 대한 면역조직화학검사(αMyosin-FITC)의 현미경 사진이다

도 6은 신경세포로의 분화(Neurogenesis)에 있어서, NM3229배지(신경세포 분화용 배지)에서 10일간 유도한 양막(A) 및 기저탈락막(B) 유래 줄기세포에 대한 면역조직화학검사(αGFAP-FITC)의 현미경 사진이다.

도 7은 골세포로의 분화(Osteogenesis)에 있어서, 양막(B) 및 기저탈락막(C) 유래 줄기세포에 대하여 Alizarin red S 염색 방법으로 염색한 사진이다[A: 대조군; B: 골세포 분화조건 하의 양막 유래 줄기세포; C: 골세포 분화조건 하의 기저탈락막 유래 줄기세포].

도 8은 지방조직세포로의 분화(Adipogenesis)에 있어서, 양막(B) 및 기저탈락막(A) 유래 줄기세포에 대하여 Oil red O 염색법으로 염색한 사진이다

도 9는 OCT4에 대한 RT-PCR결과이다[레인 1: 마커; 레인 2: RT-reaction control; 레인 3: 양막 줄기세포; 레인 4: 기저탈락막 줄기세포; 레인 5: PCR-reaction control].

도 10은 각각에 표기된 특정 항체를 이용한 면역조직화학검사 결과사진이다[A: OCT4; B: SSEA4; C: CD44, CD54 및 대조군].

도 11은 기저탈락막 유래 줄기세포에 대한 계대수에 따른 축적 집단 배가정도(cumulative population doubling level, CPDL)를 나타낸 그래프이다.

도 12는 양막 유래 줄기세포에 대한 계대수에 따른 축적 집단 배가정도(CPDL)를 나타낸 그래프이다.

Figure 1 is a microphotography about the form (morphology) of the placenta originated mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cell, MSC).

Figure 2 is a result analyzing surface antigens of the decidua basalis originated MSC using the Flow Cytometer (FACS).

Figure 3 is a result analyzing surface antigens of the amnion originated MSC using the Flow Cytometer (FACS).

A of fig. 4 may be the sphere formation thread gin of 1 passage decidua basalis which is the sphere formation thread gin of 1 passage amnion cultivated in the SFM culture medium with 3 days and which B cultivates in the SFM culture medium with 7 days.

Figure 5 is a microphotography of the immunohistochemistry examination (αMyosin-FITC) about the amnion (A) induced as to the differentiation (Myogenesis) in the MM-3160 culture medium (the culture medium for the muscular cell differentiation) with 10 days and decidua basalis (B) originated stem cell of the modern times captive

Figure 6 is a microphotography of the immunohistochemistry examination (αGFAP-FITC) for the decidua basalis (B) originated stem cell and the amnion (A) induced as to the differentiation (Neurogenesis) to the nerve cell in the NM3229 culture medium (the culture medium for the neural cell differentiation) with 10 days.

Figure 7 is a photograph as to the differentiation (Osteogenesis) to the bone cell, it dyes about the amnion (B) and decidua basalis (C) originated stem cell to the Alizarin red S dyeing method.

Figure 8 is a photograph as to the differentiation (Adipogenesis) to the adipose tissue cell, it dyes about the amnion (B) and decidua basalis (A) originated stem cell with the Oil red O dyeing method furnace

Fig. 9 may be the RT-PCR result about the OCT4.

Figure 10 is an immunohistochemistry examination result photo using the certain antibody being respectively written.

Figure 11 is graph showing the accumulation population boosting extent (cumulative population doubling level, CPDL) according to the passage number about the decidua basalis originated stem cell.

Figure 12 is graph showing the accumulation population boosting extent (CPDL) according to the passage number about the amnion originated 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 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.)