



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0117817
(43) 공개일자 2009년11월12일

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7019844

(22) 출원일자 2008년03월03일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년09월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/002838

(87) 국제공개번호 WO 2008/109063

국제공개일자 2008년09월12일

(30) 우선권주장

60/904,836 2007년03월01일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

크리오-셀 인터내셔널, 인코퍼레이티드.

미국, 플로리다 34677, 올즈마르, 스위트 1800,
브루커 크릭 빌딩 700

왈튼, 메르세데스 에이.

미국, 뉴저지 07945, 멘드함, 크리스타 코트 2

알릭슨, 줄리에 지.

미국, 플로리다 33556, 오데싸, 윈드함 레이크스
드라이브 1322

(72) 발명자

왈튼, 메르세데스 에이.

미국, 뉴저지 07945, 멘드함, 크리스타 코트 2

알릭슨, 줄리에 지.

미국, 플로리다 33556, 오데싸, 윈드함 레이크스
드라이브 1322

(74) 대리인

강명구

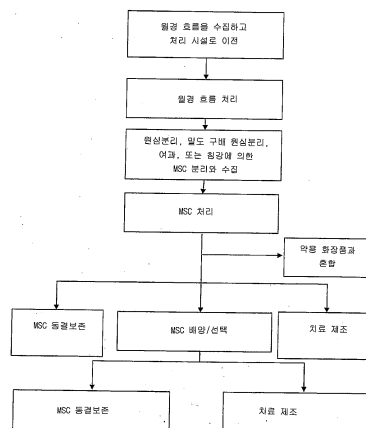
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 자궁내막/월경 세포의 획득, 분리와 동결보존

(57) 요약

월경 줄기 세포(menstrual stem cell, MSC)를 함유하는 조성물과 방법, 공정, 그리고 이들을 위한 시스템이 본 발명에 의해 제시된다. MSC는 월경(mense) 동안 수집된 월경 흐름(menstrual flow)으로부터 가공된다. MSC는 동결보존되거나, 동결보존(cryopreservation)을 위한 제조에서 다양한 배양(culturing)과 선택(selection) 단계를 통하여 가공되거나, 또는 치료 또는 화장 용도로 가공될 수 있다. 동결보존된 MSC는 치료와 화장 용도를 위한 제조에서 해동될 수 있다. MSC는 CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I을 발현하고, CD3과 HLA 클래스 II를 낮게 발현하거나 발현하지 않는다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

60/918,961	2007년03월20일	미국(US)
60/994,166	2007년09월17일	미국(US)
60/998,255	2007년10월09일	미국(US)
61/011,881	2008년01월22일	미국(US)
61/067,849	2008년02월29일	미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

CD44를 발현하는, 월경 흐름(menstrual flow)으로부터 유래된 최소한 하나의 분리된 줄기 세포(stem cell).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 줄기 세포는 세포 표면 마커(cell surface marker) CD29, CD90, CD105와 CD166 중에서 최소한 한 가지 이상을 발현하는 것을 특징으로 하는, 월경 흐름으로부터 유래된 최소한 하나의 분리된 줄기 세포.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 줄기 세포는 CD29, CD34, CD45, CD90, CD105, CD117과 CD166을 포함하는 최소한 하나의 세포 표면 마커를 낮게 발현하거나 발현하지 않는 것을 특징으로 하는, 월경 흐름으로부터 유래된 최소한 하나의 분리된 줄기 세포

청구항 4

청구항 1에 있어서, 줄기 세포는 높은 수준의 생존능(viability)을 발현하는 것을 특징으로 하는, 월경 흐름으로부터 유래된 최소한 하나의 분리된 줄기 세포.

청구항 5

청구항 1의 월경 흐름으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포와 보존제(preservation agent)를 함유하는 조성물.

청구항 6

동결보존제(cryopreservation agent), 세포 성장 배지(cell growth media), 세포 유지 배지(cell maintenance media), 세포 배양 배지(cell culture media), 제약용으로 허용되는 부형제, 또는 화장용으로 허용되는 담체 중에서 한 가지를 포함하는, 청구항 5항에 따른 보존제.

청구항 7

CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I을 포함하는 세포 마커 중에서 최소한 한 가지 이상을 발현하는 최소한 하나의 분리된 월경 줄기 세포.

청구항 8

청구항 7에 있어서, CD3, CD10, CD14, CD19, CD34, CD38, CD45, CD54, CD56, CD63, CD90, CD117, CD133, HLA 클래스 II, SSEA-3 SSEA-4와 NANOG를 포함하는 세포 표면 마커 중에서 최소한 하나를 낮게 발현하거나 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 최소한 하나의 분리된 월경 줄기 세포.

청구항 9

청구항 7의 최소한 하나의 분리된 월경 줄기 세포를 포함하는 농축된 세포 개체군.

청구항 10

청구항 7의 최소한 하나의 분리된 월경 줄기 세포로부터 파종된 확대된 세포 개체군.

청구항 11

청구항 7에 있어서, 다능성(pluripotent)인 것을 특징으로 하는 최소한 하나의 분리된 월경 줄기 세포.

청구항 12

청구항 7의 최소한 하나의 월경 줄기 세포와 보존제를 함유하는 조성물.

청구항 13

동결보존제, 세포 성장 배지, 세포 유지 배지, 세포 배양 배지, 제약용으로 허용되는 부형제, 또는 화장용으로 허용되는 담체 중에서 한 가지를 포함하는, 청구항 12에 따른 보존제.

청구항 14

CD9, CD44와 HLA 클래스 1을 포함하는 세포 표면 마커 중에서 최소한 하나를 발현하는, 월경 혈액(menstrual blood)으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포를 포함하는 분리된 세포 개체군.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 월경 혈액으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포는 세포 표면 마커 CD45를 낮은 수준으로 발현하고, 세포 표면 마커 HLA 클래스 II를 발현하지 않는 것을 특징으로 하는 분리된 세포 개체군.

청구항 16

청구항 14에 따른 월경 혈액으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포를 포함하는 농축된 세포 개체군.

청구항 17

청구항 14에 따른 월경 혈액으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포를 포함하는 확대된 세포 개체군.

청구항 18

청구항 14에 따른 월경 혈액으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포에 있어서, 다능성인 것을 특징으로 하는, 월경 혈액으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포.

청구항 19

청구항 14에 따른 월경 혈액으로부터 유래된 최소한 하나의 줄기 세포와 보존제를 함유하는 조성물.

청구항 20

동결보존제, 세포 성장 배지, 세포 유지 배지, 세포 배양 배지, 제약용으로 허용되는 부형제, 또는 화장용으로 허용되는 담체 중에서 한 가지를 포함하는, 청구항 19에 따른 보존제.

명세서

기술분야

<1> 관련된 출원에 대한 교차 참조

<2> 본 출원은 각각, "PROCUREMENT, ISOLATION, AND CRYOPRESERVATION OF ENDOMETRIAL/MENSTRUAL CELLS"를 발명의 명칭으로 하는, 2007년 3월 1일 제출된 미국 가출원 No. 60/904,836, 2007년 3월 20일 제출된 60/918,961, 2007년 9월 17일 제출된 60/994,166, 2007년 10월 9일 제출된 60/998,255, 2008년 1월 22일 제출된 61/011,881, 그리고 2008년 2월 29일 제출된 61/067,849에 우선권을 주장하는데, 이들은 본 명세서에 순전히 참조로서 편입된다.

<3> 본 발명의 기술 분야

<4> 본 발명은 전반적으로, 월경 줄기 세포(menstrual stem cell, MSC)를 획득하기 위한 방법, 공정과 시스템에 관계한다. 구체적으로, 본 발명은 동결보존(cryopreservation)을 위한, 또는 치료 또는 약용 화장 용도를 위한 제조에서 MSC를 획득하는 다양한 배양과 선택 단계를 통하여 동결보존되거나 더욱 가공되는 월경 줄기 세포의 집단을 분리하고 수집하기 위하여, 월경(menstruation) 동안 획득된 혈액(blood), 분비액(fluid)과 조직(tissue)을 획득하고 처리하는 방법, 공정과 시스템에 관계한다. 본 발명은 또한, 최소한 하나의 월경 줄기 세포를 포함하는 물질의 조성물에 관계한다.

배경 기술

<5> 줄기 세포는 선천적으로, 세포-세포 접촉(cell-to-cell contact)과 내재성 신호(intrinsic signal)의 제어에

의해, 생체내에서 세포 분열(cellular division)과 세포 분화(cellular differentiation)를 진행하는 능력을 갖는다. 줄기 세포는 국소 환경 인자(local environmental factor)로 자극에 의해 세포 접촉과 내재성 신호를 제어함으로써 시험관내에서 다양한 세포로 분열하고 분화할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 줄기 세포는 다양한 성체 조직(adult tissue), 예를 들면, 골수(bone marrow)와 배아 조직(embryonic tissue)을 비롯한 여러 출처로부터 획득될 수 있는 것으로 인정되고 있다.

<6> 특정 줄기 세포는 c-키트 수용체, Steel 인자 수용체와 줄기 세포 인자 수용체로 알려져 있는 항원성 인자 CD117을 발현한다. c-키트에 대한 유전자는 비만 세포 성장 인자(mast cell growth factor)로 알려져 있고, 조혈(hematopoiesis), 멜라닌형성(melanogenesis)과 수태능력(fertility)에 필수적인 줄기 세포 인자(stem cell factor, SCF)에 대한 티로신 키나아제 성장 인자 수용체(tyrosine kinase growth factor receptor)를 인코딩한다. CD117은 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell), 비만 세포(mast cell), 생식 세포(germ cell), 멜라닌 세포(melanocyte), 특정의 기저 상피 세포(basal epithelial cell), 유방의 속막 상피(luminal epithelium), 그리고 위장관(gastrointestinal tract)의 Cajal의 간세포(interstitial cell)에서 발현되는 것으로 인정되고 있다. CD117은 생식 세포 확립, 유지와 기능에서 결정적인 역할을 제공한다. 연구에 따르면, 태아 생식선(embryonic gonad)에서, CD117과 이의 상응하는 리간드 SCF는 원시 생식 세포(primordial germ cell) 생존과 증식에 필수적이다. 부가적으로, 연구에 따르면, CD117과 이의 상응하는 리간드 SCF는 성선자극 호르몬(gonadotropic hormone)에 대한 반응으로, 생식체 생산(gamete production)에 필수적이다. 다시 말하면, 리간드 SCF와 조합으로 CD117은 고환(testis)의 생식 세포인 정조세포(spermatogonia)의 생존과 증식, 그리고 난모 세포(oocyte)의 성장과 성숙에 필수적이다. 또한, 연구에 따르면, CD117은 시험관내에서 원시 조혈 세포 증식을 위한 강력한 성장 인자이다.

<7> 줄기 세포의 치료 적용은 골수의 초기 실험으로 시작되었다. 거의 한 세기 전에, 의사들은 빈혈(anemia)과 백혈병(leukemia) 환자에 구강으로 골수를 투여하였다. 이런 요법이 성공적이진 않았지만, 실험실 연구자들은 궁극적으로, 결합성 골수를 갖는 생쥐가 다른 생쥐로부터 채취된 골수의 혈류(blood stream) 내로의 주입으로 건강하게 회복될 수 있음을 증명하였다. 이로 인하여, 의사들은 한 인간으로부터 골수의 다른 인간으로의 이식(동종 이식(allogeneic transplantation))이 가능한 지를 숙고하였다. 골수와 배꼽(umbilical)으로부터 줄기 세포는 주로, 다양한 질환을 치료하기 위한 조혈 이식(hematopoietic transplant)에서 광범위하게 이용되고 있다. 골수를 이용하는 일차 줄기 세포 이식으로부터, 줄기 세포에 대한 다른 공급원에는 양수(amniotic fluid), 태반(placenta), 제대(umbilical cord), 제대 속막(cord lining), 와튼 제대교질(Wharton's Jelly), 지방(fat), 그리고 상피 세포(epithelial cell)가 포함되는 것으로 밝혀졌다.

<8> 감염(infection)과 외래 물질(foreign substance)로부터 자신을 방어하는 인체 본래의 기전인 인간 면역계(immune system)의 효과는 연구자들이 차후에 이식편 대 숙주 질환(Graft versus Host Disease, GVHD)로서 특징화되는 신체의 세포 거부반응에 기인한 질환 및/또는 치사(fatality)에 직면함에 따라서, 초기 이식에서 중요한 고려 사항이 되었다. 인간에서 골수 이식을 수행하는 것은 인간 조직적합성 항원(human histocompatibility antigen)과 인간 면역계 사이에 상관관계가 밝혀질 때까지, 대규모로 시도되지 못하였다. 체내에서 대부분의 세포의 표면에서 관찰되는 이들 단백질은 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen), 또는 HLA 항원으로 불린다. 신체의 면역계는 이들 HLA 항원을 이용하여 어떤 세포가 자기 신체에 속하고 어떤 세포가 속하지 않는 지를 확인한다. 면역계는 세포 상에서 항원을 인식하지 못하면, 항체와 기타 물질을 발생시켜 상기 세포를 파괴한다. 신체가 추적하여 파괴하는 물체는 감염-유발 세균, 바이러스, 종양 세포, 그리고 외래 물체, 예를 들면, 부서진 조각(splinter)이다. 이러한 방식으로, 면역계는 신체에 침입하여 손상을 유발할 수 있는 물체로부터 신체를 보호한다. 치료에 표적되는 질병 상태(disease state)에 따라서, 개체 자신의 줄기 세포를 이용한 자가 이식(autologous transplantation)은 정확한 HLA 매치(match)의 혜택에 기인한 특정의 잠재적인 이점을 갖는다. 공여자와 수용자의 HLA 항원 매치가 가까울수록, 공여된 골수의 T 세포(면역계 세포)가 환자의 신체에 반발할 가능성이 낮아진다.

<9> 골수로부터 유래된 성체 줄기 세포(adult stem cell)의 이식은 판코니 빈혈(Fanconi's anemia), 재생불량성(aplastic anemia), 급성 및 만성 백혈병, 골수증식 질환(myeloproliferative disorder), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 림프증식 질환(lymphoproliferative disorder), 그리고 기타 악성 종양(malignancy)과 같은 인간 질환의 치료에 성공적으로 이용되고 있다. 골수 성체 줄기 세포의 대안적 공급원에는 말초혈 전구 세포(peripheral blood progenitor cell), 제대혈(umbilical cord blood), 그리고 이들 공급원으로부터 수확된 간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)가 포함된다. 하지만, 성체 줄기 세포의 치료적 이용과 연관된 여러 단점이 존재한다. 성체 줄기 세포는 수차례의 계대배양(passage in culture) 이후에 느린 성장과

다능성(pluripotency) 상실과 같은 제한된 효능을 갖는 것으로 밝혀졌다.

- <10> 배아 줄기 세포(embryonic stem cell)는 세포 요법(cellular therapy)에 적합할 수 있는 증식 잠재력(proliferative potential)을 보였다. 하지만, 인간 배아 줄기 세포는 기형종(teratoma)을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 부가적으로, 배아(embryo)로부터 줄기 세포의 수확은 부분적으로, 수확 과정 동안 성장 배아의 파괴에 기인한 윤리적 우려를 유발한다.
- <11> 성체와 배아 줄기 세포와 연관된 문제점 중에서 최소한 일부를 극복하는 줄기 세포의 다른 공급원이 확인되었다.
- <12> 한 가지 공급원은 인간 성체 줄기 세포를 내포하는 제대혈이다. 제대혈은 여러 이유로, 줄기 세포의 실용적인 공급원인 것으로 입증되었다. 제대혈은 출산 동안 획득하고 동결보존(cryopreservation) 처리를 진행하기가 상대적으로 용이하다. 제대혈은 세포 분열(cellular division)과 다양한 세포 유형(cell type)으로의 분화(differentiation)가 가능한 줄기 세포의 적절한 공급원을 제공한다. 제대혈로부터 유래된 줄기 세포는 골수의 대안으로서, 여러 공지된 인간 질환과 질병을 치료하기 위한 임상적 환경(clinical setting)에 이용되고 있다. 특히, 제대혈로부터 유래된 줄기 세포는 조혈 이식(hematopoietic engraftment), 조혈 재구성(hematopoietic reconstitution), 그리고 척수(spinal cord) 손상 치료에 성공적이었다. 부가적으로, 제대혈로부터 유래된 줄기 세포는 동물 모형에서, 뇌졸중(stroke)과 심근 경색(myocardial infarction)의 효과를 반전시키는 것으로 밝혀졌다.
- <13> 자궁내막(endometrial)/월경 줄기 세포(menstrual stem cell, MSC)는 배양 동안, 배아 줄기 세포와 유사한 증식 능력(proliferative capacity)을 나타내는 것으로 밝혀졌다. MSC는 또한, 시험관내와 생체내에서 다능성 능력에 대한 잠재력을 나타내는 특성의 간엽 줄기 세포 마커와 특성의 배아 줄기 세포 마커를 전사한다. 줄기 세포의 공급원으로서 MSC의 이용은 여러 이유로 유익하다. 첫째, MSC는 특정 세포 계통(cell lineage)으로 분화하는 능력을 나타낸다. 둘째, 폐기물로 간주되는 MSC를 수집함으로써 윤리적 우려와 고려가 발생하지 않는다. 마지막으로, 월경 주기(menstrual cycle) 동안 MSC를 획득하는 과정은 공여자에 대한 위험을 거의 유발하지 않는다.
- <14> MSC를 수집하고 적정 시료량(sample amount)의 MSC를 획득하는 것과 관련된 공지된 방법은 존재하지 않고, 특성의 간엽 줄기 세포 마커 및/또는 MSC에 의해 발현되는 다른 세포 표면 인자(cell surface factor) 중에서 특성의 배아-유사 항원성 인자(embryonic-like antigenic factor)를 발현하는, 가능한 최대 수율의 MSC를 획득하는데 유용한 관련된 공정과 세포 수집 방법 역시 존재하지 않는 것으로 생각된다.
- <15> 따라서 MSC를 분리하고 동결보존하거나 처리하기 위하여 월경(menstruation) 동안 흘러나온 분비액, 혈액과 조직을 처리하는 실험실로의 용이한 운송에 대비하여, 이러한 분비액, 혈액과 조직 내에 존재하는 적절한 양의 MSC를 수집하는 방법이 현재 요구된다. 또한, 월경 분비액, 혈액과 조직으로부터 유래된 MSC의 세포 제조물(cell preparation)을 획득하기 위하여 이러한 월경 분비액, 혈액과 조직을 처리하는 방법이 현재 요구된다. 또한, 동결보존, 추가적인 가공 또는 치료적 이용에 대비하여 월경 흐름(menstrual flow)으로부터 MSC, 예를 들면, CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I를 포함하는 세포 표면 마커 또는 세포내 마커 중에서 최소한 한 가지를 발현하지만 세포 마커 CD3과 HLA 클래스 II 중에서 최소한 한 가지를 거의 또는 전혀 발현하지 않는 발현하는 세포를 분리하고, 선택하고 및/또는 배양하는 것이 요구된다. 다른 세포 마커 특징에는 본 발명의 구체예의 실시의 결과가 제공된다. 이에 더하여, 월경 혈액, 분비액과 조직으로부터 획득되고 수집된 MSC 집단 또는 특정 MSC를 동결보존하는 것이 요구된다.
- <16> 본 발명의 요약
- <17> 수집, 처리와 동결이 용이하고, 치료, 약용 화장 또는 기타 용도를 위한 잠재력을 나타내는 줄기 세포의 공급원이 현재 요구된다. 이러한 요구는 본 발명의 방법, 공정과 조성물에 의해 충족된다.
- <18> 본 발명에서는 월경 줄기 세포를 획득하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 월경 동안 수집된 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계를 포함한다. 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계는 원심분리(centrifugation), 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation), 여과(filtration), 또는 침강(sedimentation) 중에서 최소한 한 가지 단계로 월경 흐름을 처리하는 것을 포함한다. 월경 줄기 세포를 분리하는 단계는 또한, 최소한 한 가지 항생제를 함유하는 용액으로 월경 줄기 세포를 정화하는 것을 선택적으로 포함한다. 이러한 구체예에서, 상기 방법은 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 처리하는 추가 단계를 포함한다. 월경 흐름 시료로부터 분리된 월경 줄기 세포를 처리하는 단계는 특성의 세포 표면 마커에 대한

월경 줄기 세포를 선택하거나, 또는 처리후 시료, 선택된 시료, 또는 월경 줄기 세포의 해동된 시료로부터 월경 줄기 세포를 배양하는 최소한 하나의 단계를 포함할 수 있다.

- <19> 한 구체예에서, 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 처리하는 단계는 CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I를 포함하는 최소한 하나의 세포 마커에 대한 월경 줄기 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 선택된 세포는 이들 월경 줄기 세포를 배양함으로써 더욱 처리될 수 있다. 배양된 월경 줄기 세포는 이후, CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I을 포함하는 최소한 하나의 세포 마커에 대한 월경 줄기 세포를 선택하는 추가 단계가 수행될 수 있다. 선택된 월경 줄기 세포는 이후, 월경 줄기 세포를 배양하는 추가 단계가 수행될 수 있다. 월경 줄기 세포를 선택하거나 배양하는 단계 이후에 임의의 시점에서, 월경 줄기 세포는 동결보존, 또는 치료 또는 약용 화장 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하는 단계가 수행될 수 있다. 동결보존을 위하여 제조된 월경 줄기 세포는 이후, 동결보존되고, 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <20> 다른 구체예에서, 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 처리하는 단계는 월경 줄기 세포를 배양하는 것을 포함한다. 배양된 월경 줄기 세포는 이후, 특정의 세포 표면 마커에 대한 월경 줄기 세포를 선택하는 단계가 수행될 수 있다. 선택된 월경 줄기 세포는 이후, 이들 월경 줄기 세포를 배양하는 추가 단계가 수행될 수 있다. 추가 배양된 월경 줄기 세포는 이후, 세포 마커에 대한 월경 줄기 세포를 선택하는 추가적인 단계가 수행될 수 있다. 월경 줄기 세포를 선택하거나 배양하는 단계 이후에 임의의 시점에서, 월경 줄기 세포는 동결보존, 또는 치료 또는 약용 화장 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하는 단계가 수행될 수 있다. 동결보존을 위하여 제조된 월경 줄기 세포는 이후, 동결보존되고, 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <21> 또 다른 구체예에서, 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 처리하는 단계는 월경 줄기 세포를 동결보존하는 단계를 포함한다.
- <22> 또 다른 구체예에서, 월경 줄기 세포를 처리하는 단계는 월경 줄기 세포와 이들 월경 줄기 세포의 생존능(viability)을 유지하기 위한 세포 배지(cell media)를 함유하는 조성물을 제조하는 추가 단계를 포함한다.
- <23> 또 다른 구체예에서, 월경 줄기 세포를 처리하는 단계는 월경 줄기 세포와 약용 화장(cosmeceutical) 제조물을 함유하는 조성물을 제조하는 추가 단계를 포함한다.
- <24> 다른 구체예에서, 동결보존된 월경 줄기 세포는 월경 줄기 세포를 배양하거나 선택하는 최소한 하나의 단계를 포함하는 추가 처리에 대비하여 해동될 수 있다. 대안으로, 동결보존된 월경 줄기 세포는 치료 또는 약용 화장 용도에 대비하여 해동될 수 있다.
- <25> 본 발명에서는 또한, 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 수집하는 공정을 제시한다. 한 구체예에서, 이러한 공정은 월경 주기 동안 월경 흐름을 획득하고; 월경 흐름을 처리 시설로 수송하고; 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 세포 제조물 내로 분리하고; 월경 줄기 세포의 세포 제조물을 처리하는 것을 포함한다.
- <26> 본 발명에서는 또한, 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 수집하는 시스템(system)을 제시한다. 한 구체예에서, 이러한 시스템은 월경 줄기 세포 분리기(menstrual stem cell isolator)(여기서, 월경 줄기 세포 분리는 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리한다); 월경 줄기 세포 수집기(menstrual stem cell collector)(여기서, 월경 줄기 세포 수집기는 월경 줄기 세포를 수집한다); 그리고 월경 줄기 세포 처리기(menstrual stem cell processor)(여기서, 월경 줄기 세포 처리기는 치료 용도 또는 동결보존을 위한 월경 줄기 세포를 제조한다)를 포함한다.
- <27> 본 발명에서는 월경 줄기 세포를 동결보존하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 이러한 방법은 월경 동안 수집된 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계, 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 수집하는 단계, 그리고 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 동결보존하는 단계를 포함한다.
- <28> 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계를 포함하는, 월경 줄기 세포를 동결보존하는 방법은 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 중에서 최소한 하나의 단계에 의해 월경 흐름을 처리하는 것을 포함한다. 월경 줄기 세포를 분리하는 단계는 최소한 한 가지 항생제를 함유하는 용액으로 월경 줄기 세포를 정화하는 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 이러한 방법은 최소한, 동결보존 또는 추가 세포 배양의 단계에 앞서, 세포 마커에 대한 월경 줄기 세포를 선택하는 최소한 하나의 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 선택된 월경 줄기 세포를 배양하는 최소한 하나의 추가 단계를 포함할 수 있다.
- <29> 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 수집하는 단계를 포함하는, 월경 줄기 세포를 동결보존하는 방법은

월경 줄기 세포를 배양하는 최소한 하나의 단계를 포함한다. 이러한 방법은 세포 배양액으로부터 월경 줄기 세포를 선택하는 최소한 하나의 단계를 포함할 수 있다.

- <30> 본 발명에서는 월경 동안 수집된 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계와 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 수집하는 단계를 포함하는 공정에 의해 획득된 월경 줄기 세포의 집단을 제시한다.
- <31> 본 발명에서는 월경 흐름으로부터 수집된 월경 줄기 세포의 집단을 농축하는 공정을 제시한다. 한 구체예에서, 이러한 공정은 월경 동안 수집된 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계와 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 수집하는 단계를 포함한다. 상기 공정은 CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I를 포함하는 군의 최소한 하나의 세포 마커에 대한 월경 줄기 세포를 선택하는 최소한 하나의 단계를 포함한다. 상기 공정은 월경 줄기 세포를 배양하는 최소한 하나의 단계를 포함할 수 있다. 상기 공정은 월경 줄기 세포를 선택하는 최소한 하나의 단계와 선택된 월경 줄기 세포를 배양하는 최소한 하나의 단계를 포함할 수 있다. 월경 줄기 세포를 분리하는 단계는 또한, 최소한 한 가지 항생제를 함유하는 용액으로 월경 줄기 세포를 정화하는 것을 선택적으로 포함할 수 있다. 대안으로, 상기 공정은 월경 줄기 세포를 배양하는 최소한 하나의 단계와 세포 배양액으로부터 월경 줄기 세포를 선택하는 최소한 하나의 단계를 포함할 수 있다.
- <32> 본 발명에서는 월경 줄기 세포의 집단을 농축하는 공정을 제시한다. 한 구체예에서, 이러한 공정은 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하는 단계, 월경 흐름으로부터 분리된 월경 줄기 세포를 회수하는 단계, 그리고 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 월경 줄기 세포를 선택하는 단계를 포함한다.
- <33> 본 발명에서는 CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD 105, CD166과 HLA 클래스 I를 포함하는 세포 마커 중에서 최소한 하나를 포함하는 월경 줄기 세포의 집단을 제시한다.
- <34> 본 발명에서는 CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD 105, CD 166과 HLA 클래스 I를 포함하는 세포 마커 중에서 최소한 하나를 발현하고, 세포 마커 CD3과 HLA 클래스 II 중에서 최소한 하나를 포함하는 세포 마커를 거의 또는 전혀 발현하지 않는 월경 줄기 세포를 포함하는 세포의 농축된 집단을 제시한다.
- <35> 본 발명에서는 최소한 하나의 월경 줄기 세포와 동결보존제(cryopreservation agent)를 함유하는 조성물을 제시한다.
- <36> 본 발명에서는 최소한 하나의 월경 줄기 세포와 세포 배지를 함유하는 조성물을 제시한다.
- <37> 본 발명에서는 최소한 하나의 월경 줄기 세포와 약용 화장품(cosmeceutical agent)를 함유하는 조성물을 제시한다.
- <38> 본 발명에서는 최소한 하나의 월경 줄기 세포와 세포 생존능을 유지하기 위한 보존제(preservation agent)를 함유하는 조성물을 제시한다.
- <39> 본 발명에서는 최소한 하나의 월경 줄기 세포의 치료 용도에 대비하여 용기 내에서, 최소한 하나의 월경 줄기 세포와 세포 배지를 함유하는 조성물을 제시한다.
- <40> 본 발명에 따라서 수집된 세포는 치료, 약용 화장, 재생 의학(regenerative medicine), 또는 다른 적합한 적용에 이용될 수 있다.
- <41> 본 발명에서는 월경 혈액, 분비액, 세포와 조직을 포함하는 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 수집하고, 월경 흐름 시료와 수집 배지(collection media)를 통합함으로써 수송을 위한 월경 흐름을 준비하고, 그리고 월경 흐름 시료를 처리 시설로 수송하는 방법과 공정을 제시하는데, 상기 처리 시설에서 월경 흐름 시료는 동결보존, 또는 치료 또는 약용 화장 용도를 위하여 MSC를 분리하고, 수집하고, 처리하기 위하여 가공된다.
- <42> 본 발명에서는 또한, 높은 수율의 생존 MSC를 산출하는 방식으로, MSC를 분리하고, 수집하고, 농축하기 위한 방법과 공정을 제시한다.
- <43> 한 구체예에서, 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 월경 줄기 세포와 함께 존재하는 최소한 하나의 세포 마커를 발현하는 세포를 양성적으로(positively) 선택하는 것을 포함할 수 있다. 대안으로, 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 월경 줄기 세포와 함께 존재하지 않는 세포 마커를 발현하는 원치 않는 세포를 제거함으로써 세포를 음성적으로(negatively) 선택하는 것을 포함할 수 있다. 음성적 선택(negative selection)은 예로써, CD45, 또는 월경 줄기 세포 상에 존재하지 않는 다른 세포 표면 마커를 발현하는 세포를 선택하는 것을 포함할 수 있다.

- <44> 다른 구체예에서, 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 상업적으로 가용한 고갈(depletion) 또는 농축(concentration) 키트, 예를 들면, RosetteSep, EasySep, RoboSep, StemSep, 또는 SpinSep(Stem Cell Technologies, Inc)를 이용하는 것을 포함할 수 있다.
- <45> 또 다른 구체예에서, 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 MSC를 선택하고 본래 세포 막(cellular membrane)이 없는 사멸된 및/또는 사멸되는 세포를 제거하는 ALDEFLUOR[®](Aldagen, Inc.)을 이용하여 월경 줄기 세포를 선택하는 것을 포함할 수 있다. ALDEFLUOR[®] 키트는 월경 줄기 세포, 계열-항원 음성(lineage-antigen negative, Lin⁻) 세포, 콜로니-형성 세포(colony-forming cell), 장기-배양 개시 세포(long-term culture initiating cell), 그리고 NOD/SCID 재증식 세포(repopulating cell)와 함께 존재하는 표면 마커에 대하여 양성인 ALDH^{br} 세포를 선택하는데 이용될 수 있다.
- <46> 또 다른 구체예에서, 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 유관한 MSC 마커를 발현하는 MSC를 농축하기 위하여, 이들 월경 줄기 세포를 대략 2 주 내지 대략 4 주 동안 혈청 기아(serum deprivation) 처리하는 것을 포함할 수 있다. 일단 이들 세포가 수확되고 배양되면, 조혈 줄기 세포는 제거되어야 한다.

발명의 상세한 설명

- <91> 본 발명에 관한 이해는 동반된 설명과 도면에서 기술된 바와 같은 특징의 전형적인 구체예와 공동으로, 본 발명의 구체예에 관한 아래의 상세한 설명을 고려하면 용이할 것이다. 본 발명의 도면과 설명은 본 발명의 명확한 이해를 위하여 적합한 요소를 예시하기 위하여 단순화된다.
- <92> 도 1 내지 44를 참조하면, 본 발명에서는 본 명세서에서 "월경 흐름"으로 지칭되는, 월경 동안 흘러나오는 혈액, 세포, 분비액과 조직으로부터 분리된 월경 줄기 세포의 획득과 수집에 연관된 방법, 공정, 시스템과 조성물을 제시한다. 본 발명의 명세서 전반에서, "자궁내막/월경 세포", "자궁내막/월경 줄기 세포", "월경 줄기 세포"와 "월경 세포", 그리고 "MSC"와 "세포"는 CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD49f, CD59, CD81, CD105, CD166과 HLA 클래스 I이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 최소한 하나의 세포 마커 또는 세포내 마커를 발현하지만 CD3과 MHC II를 거의 또는 전혀 발현하지 않는 월경 흐름으로부터 수집된 하나 이상의 세포에 관련하여 일반적으로 이용된다. "세포"는 단수 의미로서 이용되지만, 본 발명의 하나 이상의 세포를 지칭하기 위하여 복수 의미로서 이용될 수도 있다. 세포의 상기한 특성이 전형적인 특성으로서 제공되긴 하지만, 임의의 표와 도면에서 제공된 특성이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, 월경 줄기 세포의 부가적인 세포 표면 특성이 본 발명의 명세서 전반에 제공되는데, 이들은 본 발명의 월경 줄기 세포에 관한 추가적인 개시를 제공한다.
- <93> 특히, 도 36 내지 38을 참조하면, 일부 줄기 세포는 다수의 상이한 세포 유형으로 분화하는 능력으로 인하여 본질적으로 다능성인 것으로 인정된다. 다능성 세포는 다수의 상이한 포유동물 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖는다. 특히, 본 발명의 MSC는 도 36 내지 38에 예시된 바와 같이 다수의 상이한 세포 계통(cell lineage), 예를 들면, 신경, 심장발생(cardiogenic), 연골형성(chondrogenic), 지방형성(adipogenic)과 골형성(osteogenic) 계통으로 분화하는 능력을 발현한다.
- <94> 본 발명의 MSC는 체내에서 260개의 체세포(somatic cell) 중에서 한 가지로 분화할 수 있을 것으로 생각된다. 가령, 이들 세포는 최소한 간세포, 췌장세포, 근원성세포, 골형성세포, 연골형성세포, 지방세포, 상피세포, 신경, 각질형성세포와 심근세포로 분화할 수 있다. 이들 세포는 또한, 공동-배양 시스템(co-culture system)에서 관찰되는 바와 같이, 다른 소인성(predisposed) 세포, 예를 들면, 간세포, 췌장세포, 근원성세포, 골형성세포, 연골형성세포, 지방세포, 상피세포, 신경, 각질형성세포와 심근세포와 함께 배양될 때에도 분화하는 능력을 가질 수 있다. 분화로부터 획득된 세포와 공동-배양으로 획득된 세포는 또한, 교체 또는 재생 요법, 다른 치료 적용, 약물 화장, 장기 거부반응(organ rejection) 치료, 그리고 기타 적용을 위한 치료에 이용될 수 있는 잠재력을 갖는다.
- <95> 특히, 치료, 약물 화장과 기타 적용에서 MSC의 잠재적 이용은 MSC가 (a) 생물학적 폐기물(biological waste)로서 간주되는 비-전통적인 공급원으로부터 용이하게 획득되고, (b) 의학적 훈련(medical training)의 필요 없이 공여자에 의해 쉽게 수집되고, (c) 고도 증식성이고, (d) 원하는 세포 유형으로 분화할 수 있고, (e) 자가 적용(autologous application)이 가능하고, (f) 동종 적용(allogeneic application)이 가능하고, (g) 잠재적 공급원 복수 요법(potential source multiple therapy)으로서 이용될 수 있는 단일 세포주(single cell line)를 제공할 수 있고, (h) 다른 건강한 세포와 함께 잠재적 공동-배양이 가능하고, (i) 맞춤형된 재생 건강관리 해법(customized regenerative healthcare solution)을 위한 공급원으로서 이용될 수 있고, (j) 수십 년간 규칙적

주기(regular cycle)로 편리한 복수 수집이 가능하기 때문에, 다양한 이유로 유익하다.

<96> 다른 공급원으로부터 획득된 줄기 세포의 이용은 아래의 장애에 대한 다양한 형태의 재생 의학(regenerative medicine)에서 활용되고 있다: 당뇨병(diabetes), 심근 경색(myocardial infarction), 판막(valve)/동맥(artery) 교체, 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), MS, 뇌졸중(stroke) 요법, 인슐린 재생(insulin regeneration), 항-노화 혈청(anti-aging serum), 화상/상처 치유 붕대(healing bandage), 여드름 관리(acne management), 백반(vitiligo), 모발 이식(hair replacement), 치아 재생(tooth regeneration), 유방 교체/확대, 간경변증(liver cirrhosis), 음경 확대(penile augmentation), 스포츠 요법(sports therapy), 빈혈(anemia), 백혈병(leukemia), 림프종(lymphoma), 폐 섬유증(lung fibrosis), 겸상적혈구 빈혈(sickle cell anemia), 골 대체(bone replacement), 골다공증(osteoporosis), 척추 만곡(scoliosis), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 척수 손상(spinal cord injury), 무릎/엉덩이/팔꿈치 대체, 호르몬 대체(hormonal replacement) 요법, PMS/우울증 관리, 자폐증(autism), 불임 요법(sterility therapy), 시력 재생(vision regeneration)과 렌즈 교체(lens replacement).

<97> 일반적으로, 한 구체예에서, 본 발명에서는 월경 흐름으로부터 MSC를 획득하고 수집하는 방법을 제시한다. 다른 구체예에서, 본 발명에서는 월경 흐름으로부터 MSC를 수집하는 시스템을 제시한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명에서는 월경 흐름으로부터 수집된 MSC를 동결보존하는 방법을 제시한다. 또 다른 구체예에서, MSC 집단을 포함하는 산물은 월경 흐름으로부터 MSC를 획득하고 분리하기 위한 다양한 공정에 의해 수집될 수 있다. 또 다른 구체예에서, 본 발명에서는 농축된 MSC 집단과 월경 흐름으로부터 획득된 MSC 집단을 농축하기 위한 공정을 제시한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명에서는 MSC와 다른 작용제를 함유하는 다양한 조성물, 예를 들면, MSC와 동결보존제를 함유하는 조성물, MSC와 최소한 하나의 약물 화장제를 함유하는 조성물, 그리고 MSC와 보존제를 함유하는 조성물을 제시한다. 본 발명의 이들 다양한 구체예는 하기에 더욱 상세하게 기술된다.

<98> 본 발명의 전체적인 방법과 공정의 전형적인 개요는 도 1에 예시된다. 일반적으로, 월경 흐름을 획득하고, 이러한 월경 흐름을 처리하여 특정 용도로 더욱 가공될 수 있는 MSC를 획득하기 위하여 다양한 단계가 이용될 수 있다. 특히, MSC는 동결보존되고, 세포 선택 또는 배양의 단일 또는 복수 단계를 통하여 농축되고 및/또는 치료 또는 화장 용도를 위하여 제조될 수 있다. 본 발명의 실시를 통하여, MSC와 주변 환경(surrounding environment)은 방법과 공정에 의한 품질 제어 분석(quality control analysis), 예를 들면, 수집된 MSC를 특징짓는 유동 세포 분석(flow cytometry)과 시료의 오염 여부를 확인하는 미생물학적 분석(microbiological analysis)이 수행될 수 있다.

<99> 도 1에 도시된 본 발명의 다양한 구체예는 본 발명의 작업 실시예(working example)에 관한 문자 설명과 함께, 도 2 내지 28에서 더욱 상세하게 기술된다.

<100> 도 2를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 2에 따르면, 월경 흐름은 수집 공정으로 수집되고, 이후 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 더욱 가공되고 동결보존에 대비하여 동결보존제와 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.

<101> 도 3을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 3에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특성의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 선택된 MSC에 의해 더욱 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 처리되고 동결보존에 대비하여 동결보존제와 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.

<102> 도 4를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 4에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특성의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 선택된 MSC에 의해 더욱 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 동결보존에 대비하여 동결보존제와 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.

- <103> 도 5를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 5에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 선택된 MSC에 의해 더욱 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정 MSC를 농축하거나 수집하기 위하여 특정 세포 표면 마커에 대하여 더욱 선택될 수 있다. 이들 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 동결보존에 대비하여 동결보존제와 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <104> 도 6을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 6에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 선택된 MSC에 의해 더욱 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정 MSC를 농축하거나 수집하기 위하여 특정 세포 표면 마커에 대하여 더욱 선택될 수 있다. 이들 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 더욱 배양될 수 있다. MSC는 동결보존에 대비하여 동결보존제와 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <105> 도 7을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 7에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 처리되고 동결보존에 대비하여 동결보존제와 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <106> 도 8을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 8에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 동결보존에 대비하여 동결보존제와 개별적으로 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <107> 도 9를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 9에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이들 MSC를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC 배양액은 동결보존에 대비하여 동결보존제와 개별적으로 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에 해동되고 이용된다.
- <108> 도 10을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 10에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이들 MSC를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC 배양액은 특정 세포 마커에 대하여 더욱 선택될 수 있다. 이들 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 동결보존에 대비하여 동결보존제와 개별적으로 혼합되고, 이후 동결보존된다. 동결보존된 MSC는 차후 시점에, 치료 이용을 위하여 해동된다. 본 발명의 구체예에 관한 설명 전반에서, "치료 용도"는 임의 유형의 줄기 세포 요법을 위한 MSC의 용도를 포함하고, 또한 약용 화장 용도(cosmeceutical

use)를 포함한다.

- <109> 도 11을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 11에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 처리되고, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.
- <110> 도 12를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 12에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양 후, MSC는 처리되고, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.
- <111> 도 13을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 13에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 개별적으로 혼합될 수 있다.
- <112> 도 14를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 14에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, 세포의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 개별적으로 혼합될 수 있다.
- <113> 도 15를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 15에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, 세포의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 개별적으로 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 표면 마커에 대하여 다시 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 개별적으로 혼합될 수 있다.
- <114> 도 16을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 16에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 개별적으로 혼합될 수 있다.
- <115> 도 17을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 17에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.
- <116> 도 18을 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 18에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름은

로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<117> 도 19를 참조하면, 본 발명에서는 MSC를 동결보존하는 방법과 공정을 제시한다. 도 19에 따르면, 월경 흐름은 수집되고 처리 시설로 이전되는데, 여기서 월경 흐름은 MSC를 분리하고 수집하기 위하여 처리된다. 월경 흐름으로부터 MSC의 분리와 수집은 수집된 MSC의 숫자를 극대화시키는데 이용되는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 침강 방법에 의해 수행된다. 일단 수집된 MSC는 특정의 세포 마커, 예를 들면, 하나 이상의 MSC와 연관된 세포 마커를 발현하는 MSC를 선택함으로써 농축되거나 집중될 수 있다. 선택된 MSC와 심지어 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 더욱 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도에 대비하여 세포 생존능을 유지하기 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<118> 본 발명의 다른 구체에는 도 20 내지 28에서 제시되고 기술된다. 이들 다른 구체에는 본 발명의 앞서 기술된 임의의 구체에, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 MSC를 수집하고 동결보존한 이후에 MSC의 처리를 포함한다.

<119> 도 20을 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 20에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합된다.

<120> 도 21을 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 21에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 특정의 MSC 세포 표면 마커에 대하여 선택된다. 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<121> 도 22를 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 22에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 특정의 MSC 세포 표면 마커에 대하여 선택된다. 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<122> 도 23을 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 23에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 특정의 MSC 세포 표면 마커에 대하여 선택된다. 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 특정의 MSC 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<123> 도 24를 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 24에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 특정의 MSC 세포 표면 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 MSC 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 세포와 선택되지 않은 세포는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<124> 도 25를 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 25에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<125> 도 26을 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 26에

따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 개별적으로 혼합될 수 있다.

<126> 도 27을 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 27에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<127> 도 28을 참조하면, 본 발명에서는 앞서 기술된 임의의 방법 또는 공정, 또는 임의의 다른 세포 수집 및/또는 동결보존 방법 또는 공정에 따라서 수집되고 동결보존된 MSC를 제조하는 방법과 공정을 제시한다. 도 28에 따르면, 동결보존된 MSC는 해동되고, 이후 MSC의 숫자를 확대하기 위하여 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, MSC의 숫자를 확대하기 위하여 개별적으로 배양될 수 있다. 배양된 MSC는 이후, 특정의 세포 표면 마커에 대하여 선택될 수 있다. 선택된 MSC와 선택되지 않은 MSC는 이후, 치료 용도를 위하여 세포 배지와 혼합될 수 있다.

<128> 도 1 내지 28에서 참조된 바와 같은 본 발명의 상기한 구체에는 하기에 더욱 상세하게 제시되고 기술된다. 본 발명에 따라서, 월경 줄기 세포와 다른 작용제, 예를 들면, 동결보존제, 세포 배지, 또는 약물 화장제를 함유하는 조성물 역시 하기에 제시되고 기술된다.

<129> 월경 줄기 세포 수집과 수송

<130> 본 발명의 방법과 공정에 따라서, 월경 줄기 세포는 먼저, 수집 키트와 함께 제공된 수집 장치를 이용하여, 월경 동안 월경 줄기 세포를 포함하는 월경 흐름을 수집함으로써 획득된다. 월경 흐름은 월경 기간(menstrual period)의 심한 날, 중간 날, 또는 약한 날이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 월경의 임의의 시기 동안 수집될 수 있다. 선택적으로, 비교 감염성 질환 분석(comparative infectious disease analysis)을 위하여 공여자로부터 말초혈 시료가 수집될 수 있다.

<131> 월경 줄기 세포를 처리하기 위하여 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 수집하기 위한 목적으로 공여자에게 수집 키트가 제공될 수 있다. 가령, 운송(shipment)을 위한 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 수집하고, 처리하고, 포장하기 위한 월경 줄기 세포 수집 키트가 제공될 수 있다. 수집 키트는 선택적으로, 차가운 온도에서 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 운송하는데 적합한 수송 용기(transport container), 예를 들면, 상자, 가방, 또는 기타 용기(가령, Nanocool, Styrofoam 또는 절연된 용기); 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 수집하는데 적합한 수집 장치, 예를 들면, Mooncup, Divacup, Instead 컵, 또는 임의의 다른 위생 수집 장치; 적절한 크기의 최소한 하나의 무균 수집 용기, 예를 들면, 50 ml 튜브 또는 다른 적절한 크기의 튜브; 최소한 하나의 월경 흐름 시료를 현탁하기 위한 수집 배지; 최소한 하나의 플라스틱 지퍼 가방; 최소한 하나의 흡수 타월; 최소한 하나의 멸균비닐 가방(biohazard bag); 무균 4 x 4 거즈; 최소한 하나의 수집 용기를 둘러싸기 위한 파라필름(parafilm); 살균 세척 종이수건(towelette) 또는 와이프(wipe)를 포함한다. 월경 줄기 세포를 포함하는 최소한 하나의 월경 흐름 시료를 수집하기에 앞서, 공여자에 의해 수집된 시료를 확인하기 위하여 본 발명의 실시에서 이용되는 접근 번호(accession number)가 공여자의 신원에 부여될 수 있다.

<132> 수집 키트용 수집 배지는 DPBS와 헤파린(Heparin)의 혼합물을 포함할 수 있다. 필요한 pH를 갖는 적절한 동등 조직 배양 배지가 DPBS 대신에 이용될 수 있다. 가령, 헤파린은 대략 1000 unit/ml의 농도로 제공된다. 한 구체 예에서, 수집 배지는 대략 1000 unit/ml의 농도에서 200 unit의 헤파린을 보유하는 대략 10 ml DPBS를 포함한다. 이와 같은 수집 키트용 배지는 대략 10 ml의 DPBS에 1000 unit/ml의 농도로 대략 0.20 ml의 헤파린을 첨가함으로써 제조된다. 이러한 분취량(aliquot)은 시료가 수집되기 이전에 무균 수집 용기 내에 배치될 수 있다. 다른 구체 예에서, 수집 배지는 칼슘, 마그네슘, 또는 페놀 레드(phenol red) 없음; 페니실린(대략 100 unit/ml), 스트렙토마이신(대략 100 µg/ml), 암포테리신 B 및/또는 다른 적절한 항생제를 비롯한 항생제; DPBS 배지 또는 적절한 항응고물질(anticoagulant), 예를 들면, ACD, CPD, CPDA, 또는 CPDA-1 ml당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위의 보존제-없는(preservation-free) 헤파린을 내포하는 DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffer Saline)(Mediatech, 또는 적절한 대체 배지의 다른 제조업체)를 포함할 수 있다. 이들 수집 배지는 무균 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

<133> 질 부위는 월경 줄기 세포를 포함하는 최소한 하나의 월경 흐름 시료의 수집에 대비하여 살균제로 세척될 수 있

다. 한 구체예에서, 살균제는 종이수건에 담겨 제공된다. 이후, 공여자는 수집 장치의 사용 설명서에 따라서 질 내에 이러한 수집 장치를 배치하는데, 상기 수집 장치는 비누와 물로 미리 세척된다. 수집 장치는 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 수집하기 위하여 공여자의 월경 기간 동안 질 내에 배치되어야 한다. 한 구체예에서, 수집 장치는 월경의 심한 날 동안 질 내에 배치된다. 대안적 구체예에서, 수집 장치는 월경의 중간 날 또는 약한 날 동안 질 내에 배치될 수 있다.

<134> 수집 장치는 월경 흐름의 최소한 하나의 시료를 수집하는 시간 동안 질 내에 유지되어야 한다. 가령, 수집 장치는 대략 3 시간 이하 동안 질 내에 유지될 수 있다. 시료를 수집하기 위한 추가 시간이 필요할 수도 있다. 대략 3 시간 동안 질 내에 유지된 이후에, 월경 흐름 시료를 내포하는 수집 장치는 이전될 수 있다. 월경 흐름 시료는 대략 0.1 ml 내지 대략 5 ml 체적의 월경 혈액, 조직, 분비액과 월경 줄기 세포를 포함할 수 있다. 월경 흐름 시료는 이후, 무균 수집 튜브 내에 수집 배지로 이전될 수 있다. 월경 흐름 시료의 무균 용기로의 이전은 월경 흐름 시료의 처리 시설로의 운송에 대비하여, 수집 장치로부터 용기 내에 배지로 월경 흐름 시료를 부어넣음으로써 수행된다. 용기는 월경 흐름 시료와 수집 배지의 용액의 유출을 예방하기 위하여 마개를 하거나 봉인되어야 한다. 봉인은 또한, 수집 용기의 내부로 공기의 침입을 예방해야 한다. 한 구체예에서, 뚜껑이 단단하게 밀폐된 용기는 파라필름으로 싸여지고 수송을 위하여 포장된다.

<135> 하나 이상의 월경 흐름 시료가 수집되고, 용기로 이전되고, 처리 시설로의 운송을 위하여 대비될 수 있다. 하나 이상의 월경 흐름 시료가 수집되면, 수집 튜브 내에 수집 배지에서 각 수집된 시료는 마지막 시료가 수집될 때까지 냉장 장치에 유지될 수 있다. 모든 월경 흐름 시료가 수집되면, 이들 시료는 이후, 운송을 위하여 포장될 수 있다.

<136> 한 구체예에서, 월경 줄기 세포는 자궁내막 또는 자궁경부 부위에서 수행된 파파니콜로 검사(Papanicolaou test) 또는 임의의 생검에 의해 획득된다.

<137> 월경 줄기 세포를 포함하는 월경 흐름의 최소한 하나의 시료는 획득 이후 운송과 처리 시설에서 처리까지 차가운 온도에서 유지될 수 있다. 월경 흐름과 배지의 용액을 보유하는 임의의 봉인된 용기는 처리 시설로 운송 동안 대략 1°C 내지 대략 25°C 범위의 온도에서 각 시료를 유지하기 위하여 운송용으로 포장될 수 있다. 한 구체예에서, 각 시료는 처리 시설로 운송 동안 대략 1°C 내지 대략 15°C 범위의 온도에서 유지될 수 있다. 다른 구체예에서, 수집된 월경 흐름 시료는 획득 이후 운송까지 실온에서 유지될 수도 있다.

<138> 월경 줄기 세포와 수집 배지를 포함하는 월경 흐름 시료를 내포하는 각 수집 용기는 가방의 지퍼 기능(zip function)으로 봉인된 대형 플라스틱 지퍼 가방(plastic zip bag) 내에 상기 수집 용기를 배치함으로써 수송용으로 포장될 수 있다. 멸균된 용기가 동봉된 대형 플라스틱 가방은 두 번째 대형 지퍼 가방 내에 배치되고 봉인될 수 있다. 2개의 흡수 타월이 수송 용기의 바닥에 배치될 수 있다. Nanocool 장치가 이용되면, 추가 얼음이 불필요하다. 월경 흐름 시료를 운반하는 수송 용기를 냉각하기 위하여 다공질 벽돌(foam brick) 또는 다른 장치가 이용될 수 있다. 얼음물(wet ice)로 채워진 가방이 이들 흡수 타월의 정상에 배치될 수 있다. 봉인된 가방 내에서 멸균된 용기는 얼음주머니(ice bag)의 아래에 배치될 수 있다. 남아있는 흡수 타월은 얼음주머니의 정상에 배치될 수 있다. 수송 용기는 밀폐되고, 안전하게 저장되고, 봉인된다.

<139> 운송 동안 월경 줄기 세포를 포함하는 월경 흐름 시료를 대략 1°C 내지 대략 25°C 온도로 유지하면, 다른 적합한 용기가 용기의 수송에 이용될 수 있다. 가령, 다른 적합한 용기에는 Therapak Corporation에 의해 판매되는 냉각되고 절연된 운송 용기, 임의 유형의 절연된 용기, 또는 운송용으로 설계된 Styrofoam 상자가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<140> 운반업체는 수집 배지 내에 최소한 하나의 월경 흐름 시료를 내포하는 수송 용기를 집배하기 위하여 최소한 2시간의 운송 이내에 접촉할 수 있다. 운반업체는 생물학적 물질을 수송하는데 적합한 AirNet 또는 다른 적합한 항공사, 또는 다른 운송 회사, 예를 들면, FedEx 또는 UPS일 수 있다. 수송 용기는 수집후 대략 5 시간 내지 대략 125 시간 이내에 처리 시설에 도달해야 한다. 한 구체예에서, 수송 용기는 수집후 대략 24 시간 내지 대략 72 시간에 처리 시설에 도달한다. 다른 구체예에서, 수송 용기는 대략 24 시간 내지 대략 48 시간에 처리 시설에 도달한다. 수송 용기는 고온 환경에서 저장되어서는 안 된다.

<141> 처리 시설은 수송 용기를 접수하고, 월경 줄기 세포를 포함하는 월경 흐름 시료를 처리하는 동안 이용을 위한, 각 공여자 시료에 대한 신원 정보(identification information)를 분류한다. 처리 시설에서 월경 줄기 세포를 포함하는 월경 흐름의 시료를 취급하는 동안 적절한 방법과 개인 보호 조치가 이용될 수 있다. 수송 용기가 처리 시설에서 접수되면, 월경 흐름 시료를 내포하는 각 용기는 수송 용기로부터 이전되고, 얼음 팬(ice pan)(또

는 냉장 장치) 내에 얼음 위에 배치되고, 그리고 월경 흐름으로부터 월경 줄기 세포를 분리하고, 월경 줄기 세포를 수집하고, 이용 및/또는 동결보존 목적으로 차후 처리를 위하여 생물 안전 작업대(biological safety cabinet, BSC) 내에 무균실(cleanroom)로 이전될 수 있다.

<142> **처리 시설에서 월경 흐름 처리**

<143> 월경 흐름 시료는 처리 시설에 의해 접수되고 처리 시설 시스템 내로 기록된다. 월경 흐름 시료는 처리 시설에서 접수되면, 처리 동안 대략 1℃ 내지 대략 25℃의 온도에 유지될 수 있다. 각 월경 흐름 시료는 BSC에서 처리되고 무균 기술을 이용하여 원심분리될 수 있다. BSC에서 작업할 때 빈번하게, 70% IPA로 장갑을 닦는다. 월경 흐름 시료를 처리하기 위해 앞서, 레드 탑 튜브(red top tube), 바늘, 주사기, 레드 탑 튜브용 선반, BacT 병, 알코올 패드, 50 ml 삼각 튜브, 50 ml 삼각 튜브용 선반과 피펫터(pipettor)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는, BSC에서 처리에 필요한 모든 다른 물질을 무균 배치한다. 모든 무균 공급품은 BSC를 살균한 이후에, 설치된다. 본 발명의 공정에 이용되는 모든 무균 공급품은 접시(pan) 또는 무균 드레이프(drape) 내에 배치될 수 있다. 무균 공급품에는 바늘, 주사기, 그리고 레드 탑 튜브, 레드 탑 튜브용 선반, 혈액 배양 병, 알코올 패드, 50 ml 삼각 수집 튜브, 50 ml 삼각 수집 튜브용 선반, 피펫(pipette)과 얼음 팬을 비롯한, BSC 내에 배치되는 다른 물질이 포함된다. 모든 배지와 반응물은 가급적, 얼음 위에 배치되고, 제조업자의 지시에 기초하여 대략 1℃ 내지 대략 15℃, 또는 대략 2℃ 내지 대략 8℃에 저장된다.

<144> 완충된 염수 배지(DPBS) 또는 적절한 대체물이 월경 줄기 세포 분리 공정 동안 이용될 수 있다. DPBS 배지는 대략 5 ml 내지 대략 10 ml의 헤파린(헤파린 나트륨 1,000 USP unit/ml - American Pharmaceutical Partners)과 함께, 대략 100 ml의 DPBS를 포함한다.

<145> 월경 흐름 시료가 처리 시설에서 접수되는 당일에, 월경 줄기 세포를 포함하는 각 월경 흐름 건본은 1 단계 처리가 수행될 수 있다. 먼저, 월경 흐름 시료를 보유하는 수집 용기의 외부가 원심분리에 앞서 살균된다. 수집 용기 내에 월경 흐름 시료는 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과 및/또는 전분 침강이 수행된다.

<146> **원심분리**

<147> 한 구체예에서, 월경 흐름 시료의 원심분리는 대략 4℃에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm에서 수행된다. 원심분리후, 월경 흐름 시료의 각 건본은 이후, 원심분리기로부터 제거된다. 수집 용기의 외부는 상층액을 흡출하기 위한, 수집 튜브의 BSC로의 이전에 앞서 살균된다. 펠릿(pellet)은 대략 10 ml의 DPBS, 또는 동등 대체물에서 재현탁되고, 이후 2 단계 처리가 수행된다. 펠릿은 또한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 선택적 정화 단계에 따라 처리될 수도 있다.

<148> **밀도 구배 원심분리**

<149> 다른 구체예에서, 월경 흐름 시료의 원심분리는 밀도 구배(density 구배)를 이용하여 수행될 수 있다. 가령, 밀도 구배는 림프구 분리 배지(대략 20℃에서 밀도 1.077 - 1.083 g/ml - Cellgro), 또는 더욱 높은 또는 더욱 낮은 밀도를 갖는 다른 적절한 구배이다. 월경 흐름 시료, 수집 배지, 그리고 밀도 구배를 내포하는 삼각 수집 튜브는 원심분리된다. 가령, 삼각 수집 튜브는 대략 15℃ 내지 대략 30℃, 바람직하게는, 대략 20℃에서, 그리고 원심분리기의 속력을 늦추기 위하여 가해지는 브레이크 없이, 대략 30분 동안 대략 14,000 rpm으로 원심분리된다.

<150> 밀도 구배 원심분리의 결과로써, 백혈구 혈소판층(buffy coat layer)이 상층액과 밀도 구배 사이의 계면에서 형성된다. 이러한 백혈구 혈소판층은 월경 흐름 시료로부터 획득된 월경 줄기 세포를 포함하는 원하는 세포 집단을 내포한다. 백혈구 혈소판층 위에서 상층액은 백혈구 혈소판층 위에서 대략 5 ml까지 흡출되고 폐기된다. 백혈구 혈소판층은 이러한 백혈구 혈소판층을 부드럽게 휘젓고, 10 ml 피펫으로 백혈구 혈소판층에서 삼각 튜브의 측면을 짜냄으로써 이전된다. 가능한 가장 적은 부피의 밀도 구배가 백혈구 혈소판층과 함께 수집된다. 남아있는 밀도 구배와 적혈구세포를 내포하는 펠릿은 폐기된다. 밀도 구배 분리는 실온에서 반응물과 세포로 수행될 수 있다. 이러한 분리는 세포가 냉각되면, 최적 세포 회복(optimal cell recovery)을 제공하지 못할 것이다.

<151> 수집된 백혈구 혈소판층은 50 ml 삼각 수집 튜브 내에 배치되고, 부피는 세척 용액으로 대략 30 ml로 증가될 수 있다. 세포 현탁액은 이후, 대략 15℃ 내지 대략 30℃에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리될 수 있다.

<152> 원심분리후, 이들 건본은 원심분리기로부터 제거되고, 수집 용기의 외부는 상층액을 흡출하기 위한, 수집 튜브의 BSC로의 이전에 앞서 살균될 수 있다. 펠릿(pellet)은 대략 10 ml의 DPBS에서 재현탁되고, 이후 2 단계 처리

가 수행된다. 펠릿은 또한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 선택적 정화 단계에 따라 처리될 수도 있다.

<153> **여과**

<154> 또 다른 구체예에서, 월경 흐름 시료는 무균 필터에서 여과가 수행될 수 있다. 무균 필터는 대략 40 마이크론, 대략 70 마이크론, 또는 대략 100 마이크론이다. 여과는 월경 줄기 세포를 포함하는 월경 흐름 시료를 대략 1℃ 내지 대략 30℃에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리를 수행하는 것을 포함한다.

<155> 원심분리후, 이들 건본은 원심분리로부터 제거되고, 수집 용기의 외부는 상층액을 흡출하기 위한, 수집 튜브의 BSC로의 이전에 앞서 살균될 수 있다. 펠릿(pellet)은 대략 10 ml의 DPBS에서 재현탁되고, 이후 2 단계 처리가 수행된다. 펠릿은 또한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 선택적 정화 단계에 따라 처리될 수도 있다.

<156> **전분 침강**

<157> 또 다른 구체예에서, 월경 흐름 시료는 전분 침강에 의해 처리될 수 있다. 한 구체예에서, 하이드록시에틸 전분(hydroxyethyl starch)은 1:5의 비율, 다시 말하면, 대략 1 ml의 전분 : 대략 5 ml의 월경 흐름 시료로 이용된다. 각 월경 흐름 시료는 상기한 비율에 따라 혼합될 수 있다. 혼합물은 대략 6분 동안 대략 50 g에서 침강을 보조하기 위하여 원심분리가 수행될 수 있다. 혼합물은 또한, 대략 30분 동안 또는 대략 2시간까지 상기한 원심 분리 단계와 함께 또는 이러한 단계 없이 침강될 수도 있다. 침강후, 월경 줄기 세포를 포함하는 연막(buffy coat)은 이전하고, 월경 줄기 세포를 농축하기 위하여 원심분리가 수행된다. 원심분리는 DPBS에서 현탁된 월경 줄기 세포를 대략 1℃ 내지 대략 30℃에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리를 수행하는 것을 포함한다.

<158> 원심분리후, 이들 건본은 원심분리로부터 제거되고, 수집 용기의 외부는 상층액을 흡출하기 위한, 수집 튜브의 BSC로의 이전에 앞서 살균될 수 있다. 펠릿(pellet)은 대략 10 ml의 DPBS에서 재현탁되고, 이후 2 단계 처리가 수행된다. 펠릿은 또한, 본 명세서에 기술된 바와 같은 선택적 정화 단계에 따라 처리될 수도 있다.

<159> **정화**

<160> 원심분리, 밀도 구배 원심분리, 여과, 또는 전분 침강의 상기한 단계 중에서 하나에 따라 수집된 월경 줄기 세포의 시료는 선택적 정화 공정이 수행될 수 있다. 펠릿 주변에 과량의 유체는 먼저, 시료의 전체량(total volume)을 순환시킨 이후에 제거될 수 있다. 펠릿은 대략 5 ml의 정화 배지에서 재현탁될 수 있다.

<161> 정화 배지는 월경 흐름 시료를 정화하는데 이용될 수 있다. 정화 배지는 적절한 배지에 담긴 최소한 한 가지 항생제를 포함한다. 무-제한적 실례로써, 이들 항생제는 반코마이신(Vancomycin), 클라포란(Claforan), 아미카신(Amikacin), 젠타마이신(Gentamycin)과 암포테리신(Amphotericin) B 중에서 최소한 하나를 포함할 수 있다. 적절한 배지는 Hanks 균형된 염 용액(HBSS) 또는 다른 배지를 포함할 수 있다. 이들 항생제는 건조된 형태로 제공되는 경우에, 재구성(reconstitution)을 요할 수도 있다.

<162> 한 구체예에서, 정화 배지는 농도 50 µg/ml의 반코마이신, 250 µg/ml 클라포란, 100 µg/ml 아미카신, 120 µg/ml 젠타마이신과 2.7 µg/ml 암포테리신 B의 항생제를 포함할 수 있다. 항생제의 다른 농도 수준이 적합할 수 있다. 가령, 정화 배지는 대략 10 ml의 HBSS를 대략 1 g 바이알의 반코마이신에 첨가하여 대략 100 mg/ml의 농도를 달성함으로써 만들 수 있다. 대략 500 µg/ml의 농도를 달성하기 위하여 대략 1 ml의 100 mg/ml 농도의 반코마이신이 대략 199 ml의 HBSS에 첨가된다. 정화 배지를 만들기 위하여 대략 1 ml의 대략 500 µg/ml 농도의 반코마이신이 최종 바이알에 첨가될 것이다. 대략 250 mg/ml의 농도를 달성하기 위하여 대략 2 ml의 HBSS가 대략 500 mg/바이알의 클라포란에 첨가된다. 대략 2500 µg/ml 농도의 클라포란을 달성하기 위하여 대략 1 ml의 대략 250 mg/ml 클라포란 용액이 대략 99 ml의 HBSS에 첨가된다. 정화 배지를 위하여 대략 1 ml의 대략 2500 µg/ml 농도의 클라포란이 최종 바이알에 첨가될 것이다. 대략 100 mg/ml의 농도를 달성하기 위하여 대략 10 ml의 HBSS가 대략 1 g 바이알의 아미카신에 첨가된다. 대략 1000 µg/ml를 달성하기 위하여 대략 1 ml의 대략 100 mg/바이알 농도의 아미카신이 대략 99 ml의 HBSS에 첨가된다. 정화 배지를 만들기 위하여 대략 1 ml의 아미카신이 최종 바이알에 첨가될 것이다. 대략 100 mg/ml의 농도를 달성하기 위하여 대략 10 ml의 HBSS가 대략 1 g 바이알의 젠타마이신에 첨가된다. 대략 1000 µg/ml 농도를 달성하기 위하여 대략 1 ml의 대략 100 mg/ml 농도의 젠타마이신이 대략 99 ml의 HBSS에 첨가된다. 정화 배지를 만들기 위하여 대략 1.2 ml의 대략 1000 µg/ml 젠타마이신 용액이 최종 바이알에 첨가될 것이다. 대략 50 µg/ml 농도의 암포테리신 B를 달성하기 위하여 대략 2 ml의 암포테리신 B가 대략 8 ml의 무균수에 첨가된다. 암포테리신 B의 최종 농도를 달성하기 위하여 대략 0.540 ml(27 µg)의 암포테리신 B가 첨가된다.

- <163> 항생제 용액으로, 대략 1 ml의 500 $\mu\text{g/ml}$ 반코마이신, 대략 1 ml의 2500 $\mu\text{g/ml}$ 의 클라포란, 대략 1 ml의 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 아미카신, 대략 1.2 ml의 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 젠타마이신과 대략 0.540 ml(27 μg)의 암포테리신 B를 첨가하여 대략 4.74 ml의 배지를 구성함으로써 50 ml 무균 튜브 내에서 정화 배지가 만들어진다. 10 ml 최종 부피의 정화 배지를 산출하기 위하여, 대략 0.200 ml 헤파린 1000 unit/ml가 항생제 용액에 첨가되고 대략 5.06 ml의 HBSS가 항생제 용액에 첨가된다. 배지는 이용될 때까지 대략 2°C 내지 대략 8°C에서 저장될 수 있다.
- <164> 펠릿은 대략 5 ml의 정화 배지에서 재현탁될 수 있다. 세포는 덩어리(clot) 또는 다른 거대분자(macromolecule)가 존재하면, 여과가 필요할 수 있다. 재현탁된 세포가 덩어리 또는 다른 이유로 여과를 필요로 하면, 시료는 100 마이크론 필터를 이용하여 여과될 수 있다. 여과의 경우에, 현탁액은 현탁액 내에서 덩어리 크기에 따라서 100 마이크론 필터, 또는 이보다 작은 필터와 무균 50 ml 삼각 튜브를 이용하여 여과될 수 있다. 현탁액이 필터를 통과하면, 상기 필터는 추가의 항생제 배지를 이용하여 세척될 수 있다.
- <165> 정화 배지 내에서 여과되거나 여과되지 않은 세포는 정화를 위하여 배양될 수 있다. 한 구체예에서, 정화 배지 내에서 여과되거나 여과되지 않은 세포는 무균실(cleanroom)에서 냉장 장치 내에 대략 20 시간 내지 대략 30 시간 동안 대략 2°C 내지 대략 8°C에서 배양될 수 있다. 배양 동안, 세포는 회전기 내에 배치되거나, 또는 시간당 대략 1회 빈도로 첫 5 시간의 배양 동안 뒤집어질 수 있다. 정화 공정의 종결 시점에서, 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액은 2 단계 처리가 수행된다.
- <166> 정화 과정이 수행되거나 수행되지 않은, 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액은 2 단계 처리에 따라 처리될 수 있다. 2 단계 처리는 DPBS 또는 정화 배지 내에 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액을 원심분리하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 세포 현탁액의 원심분리는 대략 4°C에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm에서 수행된다. 월경 줄기 세포를 보유하는 튜브의 외부는 원심분리 이후, 그리고 BSC로의 이전에 앞서 살균될 수 있다. BSC 내에서 상층액이 제거되면, 튜브의 바닥에 세포 펠릿이 남게 된다. 이들 세포는 대략 10 ml의 DPBS로 재현탁되고 혼합되고, 이후 대략 4°C에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리될 수 있다. 원심분리후, 용기는 BSC로의 이전에 앞서, 정화될 수 있다.
- <167> 월경 줄기 세포의 세균학적 분석(bacteriological analysis)은 처리 과정에서 이 시점 동안 수행된다. BSC 내에서, 무균 기술을 이용하여, 월경 줄기 세포를 포함하는 펠릿 위에서 대략 5 ml의 상층액은 무균 주사기를 이용하여 이전될 수 있다. 대략 4 ml의 상층액은 혐기성 혈액 배양 병(anaerobic blood culture bottle) 내에 배치되고, 대략 1 ml의 상층액은 호기성 혈액 배양 병(aerobic blood culture bottle) 내에 배치될 수 있다. 이들 병은 BacT/Alert 시스템에서 이용에 맞게 구성될 수 있다. 이들 병은 이후, 제조업자의 지시에 따라서, BacT/Alert 시스템을 이용하여 배양될 수 있다. BacT/Alert 혈액 배양 병과 시스템은 본 발명의 실시예에 적합한 검사 시스템의 한 가지 실례로서 제공된다. 21 C.F.R. Section 610.12를 준수하거나, 또는 상기 CFR Section에 유사한 성능이 검증된 다른 적합한 자동화 또는 수동 혈액 배양 견본 병과 시스템 역시 이용될 수 있다.
- <168> 남아있는 상층액은 펠릿 위로부터 제거될 수 있다. 세포를 포함하는 펠릿은 DPBS 내에서 대략 5.1 ml까지 재현탁되고 혼합될 수 있다. 대략 100 μl 의 세포는 세포 계수(cell count)와 생존능(viability) 검사를 달성하는 처리후 검사를 위하여 튜브로 분취될 수 있다. 세포 계수는 자동화 또는 수동 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 수행될 수 있다. 세포 생존능 검사는 트리판 블루(trypan blue) 또는 다른 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- <169> DPBS에서 현탁된 남아있는 세포는 동결보존, 세포 배양, 세포 선택, 또는 치료 또는 화장 용도를 위하여 대비될 수 있다.
- <170> **동결보존**
- <171> 동결보존을 위하여, DPBS에서 현탁된 남아있는 세포는 동결보존에 대비하여 최소한 대략 15분 동안 얼음 위에 배치될 수 있다. 이러한 대비는 동결보존 배지를 월경 줄기 세포에 첨가하고, 혼합물에서 프로그램 냉동 장치(controlled rate freezer) 또는 다른 적절한 냉동 장치 시스템(모니터 덤프-냉동기(monitored dump-freeze) 또는 냉동 장치 용기(Nalgene))을 이용하여 월경 줄기 세포의 온도를 대략 -90°C의 최종 온도로 감소시키는 여러 온도 감소 단계를 수행하는 것을 포함한다. 적절한 프로그램 냉동 장치에는 Cryomed Thermo Forma Controlled Rate Freezer 7454(Thermo Electron, Corp.), Planar Controlled Rate Freezer Kryo 10/16(TS Scientific), Gordinier, Bio-Cool-FTS 시스템과 Asymptote EF600, BIOSTOR CBS 2100 시리즈가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.
- <172> 배지와 DMSO를 포함하는 동결보존 배지가 제조될 수 있다. 대략 3 ml의 DPBS가 용기, 예를 들면, 50 ml 삼각 튜브에 첨가될 수 있다. 대략 1 ml의 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)이 대략 3 ml의 DPBS에 첨가되

고, 이후 얼음 위에서 대략 10분 동안 냉각될 수 있다. 최종 동결보존 배지를 만들기 위하여 대략 1 ml의 냉각된 99% DMSO가 HSA와 DPBS에 첨가된다. 동결보존 배지와 세포 시료는 이후, 동결보존 배지를 세포 시료에 첨가하기에 앞서, 대략 15분 동안 얼음 위에 배치될 수 있다. 동결보존 배지를 세포 시료 내로 분취하기 위하여 배치 처리(batch processing)가 이용될 수 있다. 가령, 대략 100 μ l의 세포 현탁액의 단일 분취량은 대략 3 ml의 DPBS, 1 ml의 HSA와 대략 1 ml의 99% DMSO와 혼합될 수 있다. 대략 200 μ l의 세포 현탁액의 대략 2개 분취량은 대략 6 ml의 DPBS, 2 ml의 HSA와 대략 2 ml의 99% DMSO와 혼합될 수 있다. 세포 시료의 대략 5개 분취량은 대략 15 ml의 DPBS, 대략 5 ml의 HSA와 대략 5 ml의 99% DMSO와 혼합될 수 있다. 세포 시료의 대략 10개 분취량은 대략 30 ml의 DPBS, 대략 10 ml의 HSA와 대략 10 ml의 99% DMSO와 혼합될 수 있다.

<173> 대안적 구체예에서, 다른 동결보존 배지가 이용될 수 있다. 가령, 해동후 높은 세포 생존능 결과를 유지하기 위하여, 동결보존제를 내포하는 동결보존 배지, 예를 들면, CryoStor CS10 또는 CS5(Biolife), 프로판디올(propanediol)과 수크로오스(sucrose)로 보충된 배아 동결보존 배지(Vitrolife), 또는 SAGE 배지(Cooper Surgical)가 이용될 수 있다. 글리세롤(glycerol)이 다른 동결보존제, 예를 들면, DMSO와 함께 이용되거나, 또는 적절한 단백질을 내포하는 배지에서 대략 10%의 농도로 단독으로 이용될 수 있다.

<174> 동결보존 배지는 세포 시료에 첨가될 수 있다. 동결보존 배지는 현탁된 월경 줄기 세포와 동결보존 배지의 전체 혼합물의 부피가 동결보존 세포 혼합물의 최종 원하는 부피로 될 때까지 DPBS에서 현탁된 월경 줄기 세포에 방울방울 첨가될 수 있다. 최종 동결보존 세포 배지는 2 x 5 ml 바코드 cryoquat로 이전되고, QC 시료는 5 ml 바이알의 뚜껑에 저장될 수 있다. 피펫터를 이용하여 상기 시료의 대략 200 μ l 분취량을 이전하고 QC 뚜껑 내로 분취한다. 이들 뚜껑을 채운 이후에, 남아있는 4.8 ml의 견본을 5 ml 바이알 내로 첨가한다. 시료는 감염성 질환과 기타 분석을 위하여 발송되어야 한다. 냉동바이알(cryovial)은 CRYOMED 냉동 장치 내에 배치되고, 대략 -85°C 이하의 온도로 프로그램(controlled rate) 온도 감소가 수행된다. 동결보존된 견본은 -150°C 이하에서 액화 질소(liquid nitrogen)의 증기 내에 저장을 위하여 병커로 이전된다. 감염성 질환에 대한 검사에서 양성인 시료는 정량된다. 감염성 질환에 대한 검사에서 음성인 시료는 별도의 영구 저장소로 이전된다.

<175> 아래의 온도 감소 단계는 프로그램(controlled rate) 냉동 장치에서 프로그램될 수 있는데, 먼저 동결보존제와 월경 줄기 세포의 혼합물을 감소시킨다. 동결보존제와 혼합된 월경 줄기 세포는 냉동 장치 내에서 최종 저장에 대비하여 프로그램(controlled rate) 온도 감소가 수행될 수 있다. 프로그램(controlled rate) 감소는 세포 생존능을 유지하도록 설계될 수 있다. Cryo-Med 냉동 장치(Thermo Electron Corp.), 액화 질소 실린더와 휴대가능 Cryo-Med 냉동 장치가 냉동 장치 내에서 최종 저장에 대비한 프로그램(controlled rate) 감소에 이용될 수 있다. 세포는 대략 -90°C의 온도에 도달하기 위하여 냉동바이알 또는 냉동백(cryobag) 내에서 프로그램(controlled rate) 감소가 수행될 수 있다.

<176> 냉동백 내에서 수집된 월경 줄기 세포의 시료의 경우에, 이들 세포는 아래의 프로그램(controlled rate) 감소 프로파일 수행될 수 있다: 대략 4°C에서, -6.0°C까지 1.0°C/minute(시료), -50.0°C까지 25.0°C/minute(챔버), -14.0°C까지 10.0°C/minute(챔버), -45.0°C까지 1.0°C/minute(챔버), -90.0°C까지 10.0°C/minute(챔버), 그리고 종결(-85.0°C 이하에서 시료).

<177> 냉동바이알 내에서 수집된 월경 줄기 세포의 시료의 경우에, 이들 세포는 아래의 프로그램(controlled rate) 감소 프로파일 수행될 수 있다: 4.0°C에서 대기, -3.0°C까지 1.0°C/minute(챔버), -20.0°C까지 10.0°C/minute(챔버), -40.0°C까지 1.0°C/minute(챔버), -90.0°C까지 10.0°C/minute(챔버), 그리고 종결.

<178> 동결보존제와 월경 줄기 세포의 혼합물이 대략 -85°C 이하이면, 동결보존 바이알은 극저온 저장 단위(cryogenic storage unit)로 이전되고 대략 -135°C 이하 온도에서 액화 질소의 증기 내에 저장되거나, 또는 대안으로, 바이알은 액상 상태(liquid phase)의 액화 질소 내에 저장될 수 있다. 가령, 적절한 극저온 저장 단위에는 LN2 냉동 장치 MVE 1830(Chart Industries)이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.

<179> 유동 세포 분석

<180> 월경 줄기 세포의 수집된 시료는 색소 배제(dye exclusion)를 통하여 트리판 블루(trypan blue)로 전체 세포 계수(total cell count)와 세포 생존능에 대하여 검사될 수 있다. 월경 줄기 세포의 시료는 또한, 세포 마커를 발현하는 세포의 존재에 대하여 분석될 수 있다.

<181> 세포의 처리전 시료, 처리후 시료, 그리고 임의의 다른 시료의 전체 세포 계수와 세포 생존능은 혈구계(hemocytometer), 유동 세포 분석기(flow cytometer), 또는 세포 계수를 획득하는데 적합한 다른 수단, 예를 들면, ViCell(Beckman Coulter) 또는 현미경 상(microscopic image)에 전시된 세포를 계산하는데 적합한 소프트웨어를 사용하여 분석될 수 있다.

트웨어를 이용한 수동 계수(hand count)에 의해 정량될 수 있다.

<182> 처리전 세포는 유동 세포 분석으로 분석될 수 있다. 적세포(red cell)가 존재하면, 대략 36 ml 증류수를 50 ml 튜브와 대략 4 ml의 10X 용해 용액(lysing solution)에 첨가함으로써 1X NH4CL 용해 용액(StemKit)이 제조될 수 있다. 분석을 진행하기 위하여 고객당 대략 100 μ l의 처리전 시료가 2개의 튜브에 첨가될 수 있다. 한쪽 튜브는 CD34+/생존능 분석을 위한 것이고, 두 번째 튜브는 이소클론 대조(isoclonic control)를 위한 것이다. 대략 20 μ l의 CD45-FITC/CD34-PE가 각 튜브의 바닥에 첨가될 수 있다. 대략 20 μ l의 7-AAD 생존능 색소가 이들 튜브에 첨가된다. 혼합물은 와동되고, 이후 광으로부터 보호된 최소한 20분 동안 대략 15°C 내지 대략 30°C에서 배양될 수 있다. 이후, 대략 1 ml의 1x NH4CL 용해 용액이 각 튜브에 첨가되고 와동될 수 있다. 혼합물은 대략 15°C 내지 대략 30°C에서 대략 20분 동안 배양될 수 있다. 대략 100 μ l의 Stem-Count Fluorosphere가 각 튜브에 첨가되고 와동될 수 있다. 시료는 이후, 분석을 위하여 유동 세포 분석기에서 작업된다.

<183> 처리후 세포는 유동 세포 분석으로 분석될 수 있다. 대략 36 ml 증류수와 4 ml 10X 용해 용액(lysing solution)을 50 ml 튜브에 첨가함으로써 1X NH4CL 용해 용액(StemKit)이 제조될 수 있다. 분석을 진행하기 위하여 고객당 대략 50 μ l의 처리후 시료가 2개의 튜브에 첨가될 수 있다. 한쪽 튜브는 CD34+/생존능 분석을 위한 것이고, 두 번째 튜브는 이소클론 대조(isoclonic control)를 위한 것이다. 대략 10 μ l의 7-AAD 생존능 색소가 이들 튜브에 첨가될 수 있다. 대략 10 μ l의 CD45-FITC/CD34-PE가 첫 번째 튜브의 바닥에 첨가될 수 있다. 대략 10 μ l의 CD45-FITC/CTRL-PE가 두 번째 튜브에 첨가될 수 있다. 혼합물은 와동되고, 이후 광으로부터 보호된 최소한 20분 동안 대략 15°C 내지 대략 30°C에서 배양될 수 있다. 이후, 대략 1 ml의 1x NH4CL 용해 용액이 각 튜브에 첨가되고 와동될 수 있다. 혼합물은 대략 15°C 내지 대략 30°C에서 대략 20분 동안 배양될 수 있다. 대략 100 μ l의 Stem-Count Fluorosphere가 각 튜브에 첨가되고 와동될 수 있다. 시료는 이후, 분석을 위하여 유동 세포 분석기에서 작업된다.

<184> 월경 줄기 세포의 새로운 시료와 미리 동결보존된 월경 줄기 세포의 해동된 시료는 또한, 세포 표면 마커, 세포 생존능, 그리고 다른 세포 특징을 분석하는 유동 세포 분석에 의해 분석될 수 있다. 새로운 시료는 또한, 세포 용해(cell lysis) 이후에 아래의 프로토콜에 따라 분석될 수 있다.

<185> 동결보존된 월경 줄기 세포는 본 명세서에 기술된 해동 공정에 따라 해동되어야 한다. 세포 시료가 해동되어야 하는 경우에, 세포는 특정의 세포 계대(cell passage)를 평가하기 위하여 해동 직후에, 또는 세포가 배양된 이후에 유동 세포 분석을 필요로 한다. 동결보존된 시료는 세포가 완전히 해동되지 않도록 하면서 37°C 수조(water bath) 내에서 교반될 수 있다. 세포는 대략 1 ml의 냉각된 세척 매체 내로 이전되고, 반전(inversion)에 의해 혼합될 수 있다. 시료는 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리될 수 있다. 상층액은 제거되고, 세포는 대략 100 μ l의 세척 매체(25% HSA, DNase, 해파린, 그리고 HBSS w/Ca+와 Mg+)에서 재현탁될 수 있다. 재현탁된 세포는 이후, 대략 1분 동안 Blood Bank Serofuge에서 원심분리될 수 있다. 상층액은 제거되고, 세포는 대략 1.2 ml 외피 유체(Sheath fluid)에서 재현탁되고 와동될 수 있다.

<186> 외피 유체에서 세포는 다수의 세포 표면 마커에 대하여 분석될 수 있다. 무제한적 실례로써, 외피 유체 내에 대략 100 μ l 시료의 세포는 각 튜브 내에서 10 μ l 또는 20 μ l 부피/반응물로 아래의 반응물을 내포하는 각 튜브에 첨가되고, 상기 튜브는 표 A에 기술된 바와 같이 반응물과 시료를 혼합하기 위하여 와동될 수 있다.

표 A

<187> 유동 세포 분석 적하 개요

TUBE	FITC	PE	ECD	PCT
1	IgG	IgG	IgG	IgG
2	HLA- I	CD133	HLA- II	7AAD
3	CD9	CD54	CD45	CD10
4	CD59	CD63	CD34	CD13
5	CD49e	CD81	None	CD49f
6	CD44	CD117	None	CD38
	CD29	CD105	CD41	CD3
8	CD19	CD166	None	CD90
9	NANOG	SSEA3	None	7AAD
10	CD14	SSEA4	None	7AAD
11	None	CD56	None	7AAD

- <188> 20분 동안 실온(15-30℃)에서 배양한다. 광으로부터 보호한다. RBC를 내포하는 새로운 시료를 작업하면, 500 μ l의 용해 용액을 첨가하고 추가로 10분 동안 실온에서 배양하고 광으로부터 보호한다. 밀도 구배 또는 해동된 시료를 작업하면, 용해하지 않는다. 시료가 용해되지 않으면, 20분 배양후 1 ml의 세척 매체로 세척한다. 1분 동안 원심분리하고 상층액을 옮겨 붓는다. 시료가 용해되면, 1분 동안 시료를 원심분리하고 용해물을 옮겨 붓는다. 1 ml의 세척 매체를 첨가하고, 와동하고, 다시 원심분리하고, 이후 다시 옮겨 붓는다. 500 μ l의 외피 유체를 각 튜브에 첨가하고, 와동하고, FC500 유동 세포 분석기에서 작업한다.
- <189> 세포 마커 분석에 앞서, 새로운 세포 시료 또는 해동된 시료에서 전체 세포 계수가 수행될 수 있다. Kasumi-3 대조 세포 또는 다른 대조 세포를 이용한 유동 세포 분석을 위하여 임의 숫자의 양성 대조가 설정될 수 있다.
- <190> 세포 계수와 세포 생존능 분석을 위한 물질에는 유동 세포 분석기, Isoflow 외피 분비액, Coulter Clenz 세정제 (cleaning agent), 그리고 CD45-FITC/CD34-PE, CD45-FITC/이소클론 대조-PE, 7-AAD 생존능 색소, Stem-Count Fluorosphere, 염화암모늄(NH4CL) 용해 용액 10x 농축물과 22% 소 알부민 용액이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 반응물이 포함된다. Stem 키트™ CD34+ HPC Enumeration Kit Package Insert - Version 03 (PNIM2390); Beckman Coulter Product Corrective Action, CXP 2.0 & 2.1 Panel Interruption -3/10/06, PCA-M-D-1013; 14.3 StemLab, Build Number 200706260856, Version 3.2.1을 참조한다. 유동 세포 분석을 위한 물질에는 Isoflow 외피 유체; Coulter Clenz 세정제; 그리고 사용에 앞서 대략 20-25℃인 아래의 반응물: CD117-PE, CD29-FITC, CD34-ECD, CD44-FITC, CD45-ECD, CD90-PC5, CD105-PE, CD166-PE, IgG-FITC, IgG-PE, IgG-ECD, IgG1-PC5, HLA-I-FITC, CD133-PE, HLA-II ECD, CD9-FITC, CD54-PE, CD10-PC5, CD59-FITC, CD63-PE, CD13-PC5, CD49e-FITC, CD81-PE, CD49f-PC5, CD44-FITC, CD38-PC5, CD29-FITC, CD105-PE, CD41-ECD, CD3-PC5, CD19-FITC, NANOG-FITC, SSEA3-PE, SSEA4-PE, CD14-FITC, CD56-PE, 7-AAD 생존능 색소, 염화암모늄(NH4CL) 용해 용액 10x 농축물, 세척 매체(HBSS(Hanks + Ca와 Mg+) 500 ml, 해파린 5 ml, 인간 혈청 알부민 25% 50 ml, DNASE - 1 앰플), Kasumi-3 세포주 -CD117+ 세포, 타이머(Timer)와 와동 혼합기(Vortex Mixer)가 포함된다.
- <191> 대안적 구체예에서, 세포는 대조의 이용과 월경 줄기 세포의 새로운 시료, 처리전 시료, 처리후 시료, 또는 해동된 시료를 준비하는 방법을 비롯한 앞서 기술된 유동 세포 분석 방법과 유사한 대안적 유동 세포 분석 방법에 의해 분석될 수 있다. 또한, 세포 마커는 면역조직화학 분석으로 평가될 수 있다.
- <192> 각 시료에 대한 전체 세포 계수는 유동 세포 분석 이전에 분석될 수 있다. 시료가 $\geq 3.5 \times 10^6$ 개 세포를 내포하면, 전체 패널이 평가될 수 있다. 시료가 $< 3.5 \times 10^6$ 개 세포를 내포하면, 더욱 적은 튜브가 필요하다.
- <193> 유동 검사(flow test)가 해동을 필요로 하는 동결 시료에서 수행되는 경우에, 세포가 완전히 해동되지 않도록 하면서 37℃ 수조 내에서 바이알을 교반한다. 해동된 시료는 앞서 기술된 유동 세포 분석 방법에 대한 방법에 따라 처리되고, 세포 수에 따라서 다수의 튜브에 첨가될 수 있다(하기 표 B 참조).

표 B

유동 세포 분석 적하 개요

Reagent	Tube #1	Tube #2	Tube #3	Tube #4
CD44 FITC	20 μ l			
7AAD	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
CD117 PE	10 μ l			
CD45 ECD	10 μ l	10ul	10 μ l	
CD29 FITC		20 μ l		
CD105 PE		20 μ l		
CD90 FITC			20 ul	
CD166 PE			20 μ l	
IgG FITC				20 μ l
IgG ECD				10 μ l
IgG PE				10 μ l

- <194>
- <195> 각 튜브는 대략 20분 동안 대략 15℃ 내지 대략 30℃에서 배양한다. 광으로부터 보호한다. RBC를 내포하는 새로운 시료를 작업하면, 500 μ l의 용해 용액을 첨가하고 대략 10분 동안 동일한 온도에서 배양하고 광으로부터 보호한다. 밀도 구배 또는 해동된 시료를 작업하면, 용해하지 않는다. 시료가 용해되지 않으면, 대략 20분 배양후 1 ml의 세척 매체로 세척하고, 대략 1분 동안 원심분리하고 상층액을 옮겨 붓는다. 시료가 용해되면, 대략 1분

동안 시료를 원심분리하고 용해물을 옮겨 붓는다. 대략 1 ml의 세척 매체를 첨가하고, 와동하고, 다시 원심분리하고, 이후 다시 옮겨 붓는다. 대략 1 ml의 외피 유체를 첨가하고, 와동하고, FC500 또는 적절한 대체 유동 세포 분석기에서 작업한다.

<196> 세포 선택

<197> 세포는 본 명세서에 기술된 바와 같이 월경 줄기 세포에 대한 최소한 하나의 세포 마커에 대하여 선택될 수 있다. 세포는 또한, 바람직하지 않은 세포를 제거하는 네거티브 선택 단계가 수행될 수 있다. 세포 선택 공정 동안, 무균 기술이 이용될 수 있다. 세포 선택은 새로운 세포, 처리후 세포, 미리 동결보존된 해동된 세포, 그리고 배양중인 세포에 이용될 수 있다. 세포 선택은 최소 2.5 백만개 세포와 최대 10 백만개 세포에서 수행될 수 있다. 세포는 또한, 2.5 백만개 이하의 세포를 포함하는 시료 또는 10 백만개 이상의 세포를 포함하는 시료에서 선택될 수 있다.

<198> 세포 선택을 위한 물질에는 DNase, Pulmozyme(Genentech, Inc.) - 1개 앰플, 음성으로 또는 양성으로 선택되는 임의의 항-세포 표면 마커, 예를 들면, 항-CD117 항체(Santa Cruz 104D2 또는 YB5.58, BD Bioscience), 염소 항-생쥐 IgG 마이크로비드(microbead)와 자기장(magnetic field)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

<199> 월경 줄기 세포의 새로운 시료, 처리후 시료, 해동된 시료, 또는 배양된 시료로부터 획득된 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액은 대략 4°C에서 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리될 수 있다. 상층액은 세포 펠릿을 교란하지 않으면서 제거될 수 있다. 펠릿은 대략 100 μ l의 작업 완충액(working buffer)과 대략 20 μ l의 항-세포 표면 항체와 혼합될 수 있다. 한 구체예에서, 항-세포 표면 항체는 항-CD117 항체이다. 용해 상태에서 이들 세포는 대략 20분 내지 대략 25분 동안 얼음 위에서 배양될 수 있다. 배양후, 대략 2 ml의 작업 완충액이 이들 세포에 첨가되고, 부드럽게 혼합될 수 있다. 혼합물은 대략 4°C에서 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리될 수 있다. 원심분리후, 상층액은 펠릿을 교란하지 않으면서 흡출될 수 있다. 펠릿은 대략 80 μ l의 작업 완충액(working buffer)에 재현탁될 수 있다. 대략 20 μ l의 염소 항-생쥐 IgG가 세포 현탁액에 첨가되고, 부드럽게 혼합될 수 있다. 혼합물은 얼음 위에서 대략 30분 동안 배양될 수 있다. 배양후, 세포는 대략 2 ml의 작업 완충액을 첨가하고, 이후 용액을 혼합함으로써 세척될 수 있다. 세포는 대략 4°C에서 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리될 수 있다.

<200> 선택되지 않은 세포로부터 선택된 세포를 분리하기 위하여 칼럼이 이용될 수 있다. 칼럼은 이를 대략 500 μ l의 작업 완충액에서 적심으로써 준비될 수 있다. 원심분리후, 상층액은 펠릿을 교란하지 않으면서 흡출될 수 있다. 펠릿은 대략 500 μ l의 작업 완충액에서 재현탁될 수 있다. 세포 부착(cell adherence)을 예방하기 위하여, 세포에 추가의 DNase가 첨가될 수 있다. 세포 현탁액은 피펫을 이용하여 칼럼에 첨가될 수 있다. 항체 표지된 세포(양성 분획물(positive fraction))는 MACS 분리기에 의해 제공된 자기장에 종속하는 칼럼에 부착된다. 표지되지 않은 세포(음성 분획물(negative fraction))는 칼럼을 통과하고 수집된다.

<201> 세포 현탁액이 칼럼을 통과하고 음성 분획물로서 수집된 이후, 상기 칼럼은 세척마다 500 μ l의 작업 완충액을 이용하여 최소한 3회 세척될 수 있다. 각 세척액은 차기 세척에 앞서, 칼럼을 완전하게 통과할 수 있다. 각 세척액은 음성 분획물과 함께 수집될 수 있다. 대략 100 μ l의 음성 분획물이 분석을 위하여 이전될 수 있다. 혈구계를 이용한 세포 계수와 트리판 블루(trypan blue) 또는 다른 방법을 이용한 생존능 검사가 수행될 수 있다. 표현형 분석(phenotype analysis)은 앞서 기술된 바와 같은 유동 세포 분석을 이용하여, 또는 다른 유동 세포 분석 방법을 이용하여 진행될 수 있다. 음성 분획물은 동결보존에 대비되거나, 또는 추가의 세포 성장과 확장 및 차후 처리를 위하여 배양액 내에 배치될 수 있다.

<202> 음성 분획물을 수집하고 칼럼을 세척한 이후, 양성 분획물을 수집하기 위하여 다른 튜브가 칼럼 아래에 배치될 수 있다. 대략 1 ml의 작업 완충액을 칼럼에 첨가하고 칼럼으로부터 자기장을 제거한다. 작업 완충액과 양성 분획물이 수집된다. 양성 분획물에 대한 칼럼으로부터 가능한 많은 표지된 세포를 제거하기 위하여 플런저(plunger)가 이용될 수 있다. 대략 100 μ l의 양성 분획물이 세포 계수와 트리판 블루(trypan blue) 또는 유동 세포 분석을 이용한 생존능 검사가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 분석을 위하여 이전될 수 있다. 양성 분획물은 동결보존되거나, 배양되거나, 또는 치료 또는 확장 용도에 대비될 수 있다.

<203> MSC 세포 마커를 발현하는 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 도 3 내지 6, 8 내지 10, 13 내지 19, 21 내지 24, 그리고 26 내지 28에 도시된 바와 같은 본 발명의 구체예에 따라 수행될 수 있다. 특히, 이러한 선택은 (a) 동결보존 이전에, (b) 세포 배양의 최소한 하나의 단계 이전에 및/또는 이후에, 또는 (c) 동결보존된 세포의 해동 이후에 수행될 수 있다. 특정의 세포 마커를 발현하는 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 이러한 선택된 세

포 마커를 발현하는 농축된 세포의 집단을 제공하는데, 이들은 본 발명의 방법에 따라 추가의 세포 배양, 동결 보존, 또는 치료 또는 화장 용도에 이용될 수 있다.

- <204> 한 구체예에서, 세포 집단으로부터 CD117을 발현하는 월경 줄기 세포를 선택하는 단계는 월경 줄기 세포를 항-인간 CD117 항체로 표지하고, 이후 CD117 줄기 세포-항-인간 CD117 항체 복합체를 항-인간 CD117 항체에 결합할 수 있는 자성-표지된 항체로 표지하는 것을 포함한다. 부가적으로, 이러한 방법은 CD117을 발현하는 세포를 항-인간 CD117 항체로 표지하고, 이후 CD117 세포-항-인간 CD117 항체 복합체를 항-인간 CD117 항체에 결합할 수 있는 자성-표지된 항체로 표지하는 것을 포함한다.
- <205> CD117을 발현하는 월경 줄기 세포를 선택하는 방법은 본 발명의 방법에 따라 수집된, CD117을 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 월경 줄기 세포를 분리하는 단계는 자성-표지된 항체를 끌어당기는 자기장에 CD117 세포, 항-인간 CD117 항체와 자성-표지된 항체를 포함하는 복합체를 노출시키고 복합체의 나머지 부분을 칼럼에 노출시키고, 분석용 칼럼을 통하여 모든 다른 CD117 음성 세포를 세척하는 것을 포함한다.
- <206> CD117을 발현하는 월경 줄기 세포를 선택하는 단계 동안, 세포와 작업 완충액(Dnase를 내포하는 MACS[®] 분리 작업 완충액(separation running buffer), Miltenyi)의 세포 현탁액은 차가운 온도에 유지될 수 있다. 다른 자성 분리 키트(R&D Systems)가 이용에 적합할 수 있다. 세포 현탁액은 CD117을 발현하는 자궁내막/월경 세포를 선택하는 단계가 본 발명의 구체예에서 예시된 바와 같이 (a) 동결보존 이전에, (b) 세포 배양의 최소한 하나의 단계 이전에 및/또는 이후에, 또는 (c) 동결보존된 세포의 해동 이후에 수행된다면, 세척 용액 내에 현탁된 세포 집단을 포함할 수 있다.
- <207> 세포 현탁액은 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리될 수 있다. 펠릿은 항-인간 CD117 항체를 내포하는 작업 완충액에서 현탁될 수 있다. 가령, 작업 완충액은 예로써, 대략 pH 7.2에서 PBS, 소 혈청 알부민, EDTA와 대략 0.09% 아지드화물(또는 적절한 용액)(BD Biosciences)을 포함할 수 있다. 펠릿은 예로써, 대략 100 μ l의 작업 완충액과 인간 CD117에 대한 친화성(affinity)을 갖는 대략 5 μ g의 정제된 항체에서 현탁될 수 있다. 항체는 단클론(monoclonal) 또는 다클론(polyclonal)일 수 있다. 항체는 정제된 IgG, 또는 인간 CD117에 결합할 수 있는 다른 항체일 수 있다. 항체는 생쥐 항-CD 117 항체일 수 있다. 가령, 항체는 단클론 생쥐 항-인간 CD117 항체(Santa Cruz로부터 104D2, 또는 BD Biosciences로부터 YB5.58).
- <208> 세포, 작업 완충액과 항-CD117 항체를 포함하는 용액은 배양 기간 동안 배양된다. 가령, 배양 기간은 얼음 위에서 대략 20분 내지 대략 25분을 포함할 수 있다. 대안으로, 배양 기간은 온도가 최소한 대략 2 $^{\circ}$ C 내지 대략 8 $^{\circ}$ C 이면 대략 20분 이하로 단축되고, 또는 온도가 최소한 실온이면 대략 5분 내지 대략 10분으로 단축된다. 배양 기간후, 세포를 내포하는 용액은 결합하지 않은 항체를 제거하기 위하여 작업 완충액으로 세척되고, 이후 원심 분리될 수 있다. 가령, 원심분리는 대략 10분 동안 대략 300 g에서 수행될 수 있다. 원심분리후, 상층액은 흡출되고 분석을 위하여 존속될 수 있고, 펠릿은 작업 완충액에서 현탁된다. 가령, 작업 완충액의 부피는 대략 80 μ l일 수 있다.
- <209> 마이크로비드(microbead)가 첨부되고 항-인간 CD117 항체에 대한 친화성을 갖는 두 번째 배치(batch)의 항체가 펠릿을 현탁하는데 이용된 작업 완충액에 첨가된다. 마이크로비드는 예로써, 산화철(iron oxide)과 폴리사카라이드(polysaccharide)를 포함할 수 있다. 마이크로비드는 생분해성(biodegradable)일 수 있다. 마이크로비드는 Miltenyi Biotec으로부터 구입가능하다. 가령, 이들 두 번째 배치의 항체는 인간 CD117에 친화성을 갖는 항체, 예를 들면, 염소 항-생쥐 IgG 항체에 특이적이다. 항체는 단클론 또는 다클론일 수 있다. 항체는 생쥐 항체의 경쇄(light chain) 및/또는 중쇄(heavy chain)에 결합할 수 있다. 항체는 예로써, Miltenyi Biotec으로부터 제품 130-048-401로서 구입가능한 염소 항-생쥐 IgG 마이크로비드 배합체(conjugate)일 수 있다. 상기한 염소 항-생쥐 IgG의 2 ml 바이알은 대략 1.0×10^9 개의 전체 분리되지 않은 세포에 이용될 수 있다.
- <210> 세포 현탁액은 두 번째 배양 기간 동안 배양된다. 가령, 배양 기간은 대략 30분 내지 대략 35분 범위일 수 있다. 대안으로, 배양 기간은 배양이 대략 2 $^{\circ}$ C 내지 대략 8 $^{\circ}$ C에서 수행되면 대략 30분 이하이고, 또는 배양이 대략 실온에서 수행되면 대략 5분 내지 대략 10분일 수 있다. 배양 기간이 완결된 이후, 세포는 작업 완충액, 예를 들면, 대략 2 ml의 작업 완충액으로 세척되고, 이후 원심분리된다. 가령, 원심분리는 대략 10분 동안 대략 300 g에서 수행될 수 있다. 상층액은 흡출되고 분석을 위하여 존속될 수 있고, 세포를 내포하는 펠릿은 작업 완충액, 예를 들면, 대략 500 μ l의 작업 완충액에서 현탁된다.
- <211> **세포 분리**
- <212> CD117 줄기 세포는 CD117 줄기 세포를 분리하는 MS 칼럼을 이용하여 작업 완충액 내에서 세포 현탁액으로부터

분리될 수 있다. 가령, MS 칼럼(Miltenyi Biotec) 또는 다른 적절한 칼럼이 이용될 수 있다. 대안으로, 세포를 분리하는 다른 적절한 방법이 이용될 수 있다. 유닛(unit), 멀티스탠드(multistand), MS 칼럼과 마이크로비드를 포함하는, Miltenyi Biotec으로부터 구입가능한 MiniMACS 키트가 CD117 세포 선택에 이용될 수 있다. MS 칼럼은 이를 작업 완충액으로 씻어냄으로써 준비될 수 있다. 가령, 칼럼을 씻어내는데 이용되는 작업 완충액의 부피는 대략 500 μ l일 수 있다. 칼럼은 Miltenyi Biotec으로부터 구입가능한 MACS 분리기, 또는 자기장을 제공하는 적절한 분리기의 자기장 내에 배치된다.

<213> 작업 완충액에 담긴 세포 현탁액은 피펫, 또는 다량의 액체를 전달할 수 있는 다른 장치로 칼럼에 첨가된다. 마이크로비드에 부착된 항체와 결합하는, 항-인간 CD117 항체로 표지된 CD117 세포는 MACS 분리기의 자기장으로 인하여, 칼럼 내에 유지된다. 작업 완충액과 함께, 결합되지 않은 세포는 칼럼을 통과하고, 세포 표현형확인(phenotyping)과 세포 계수를 위하여 무균 튜브 내에 수집될 수 있다. 칼럼을 통과하는 표지되지 않은 세포는 음성 분획물로서 간주될 수 있다. 칼럼은 세포 현탁액을 첨가한 이후에 작업 완충액으로 세척될 수 있다. 가령, 칼럼은 최소한 3회, 또는 표지되지 않은 세포의 전체 또는 실질적으로 전체가 상기 칼럼을 통과하도록 하는 시간량으로 세척될 수 있다. 세포 표현형확인과 계수를 위하여 세척 단계로부터 유출물(effluent)이 수집될 수 있다. 유출물 역시 음성 분획물로서 간주될 수 있다.

<214> 표지된 CD117 줄기 세포는 칼럼을 세척한 이후에, 상기 칼럼으로부터 수집될 수 있다. 표지된 CD117 세포는 무균 튜브를 칼럼 아래에 배치하고 자기장으로부터 상기 칼럼을 이동시킴으로써 수집된다. 칼럼이 자기장으로부터 이동되면, 표지된 CD117 세포는 칼럼을 통과하고 무균 튜브 내로 들어간다. 칼럼 내에서 잔여 표지된 CD117 줄기 세포는 작업 완충액을 칼럼에 첨가하여 칼럼을 통하여 세포를 세척하고, 선택적으로, 플런저로 칼럼을 때어 내 세포를 방출시킴으로써 세척될 수 있다. 수집된 표지된 CD117 세포는 양성 분획물로서 간주될 수 있다. 표지된 CD117 세포의 더욱 정제된 집단을 획득하기 위하여, 양성 분획물은 선택적으로, 앞서 기술된 세척 절차에 따라 최소한 1회 이상 칼럼에 통과될 수 있다. 양성 분획물은 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되고, 상층액 흡출될 수 있다. 펠렛은 대략 5 ml의 작업 완충액에서 현탁될 수 있다.

<215> 양성 분획물과 음성 분획물은 생존 세포의 전체 계수를 달성하기 위하여 혈구계로 분석된다. 음성 분획물은 표현형확인을 위하여 유동 세포 분석으로 분석된다. 선택적으로, 양성 분획물은 표현형확인을 위하여 유동 세포 분석으로 분석될 수 있다.

<216> MSC 세포 마커, 예를 들면, CD117 또는 다른 세포 마커를 발현하는 줄기 세포를 내포하는 양성 분획물은 본 명세서에서 더욱 상세하게 기술된 본 발명의 방법에 따라 동결보존에 대비될 수 있다. 대략 1 ml의 인간 혈청 알부민, 대략 3 ml의 DPBS와 대략 1 ml의 DMSO가 대략 5 ml의 양성 분획물에 첨가된다. 대안으로, 세포를 동결보존에 대비시키는 단계에 다른 배양 배지, 예를 들면, 완전 배지, 소 혈청 알부민, 우 태아 혈청(fetal calf serum), 소 태아 혈청(fetal bovine serum), 단백질 혈장 분획물(protein plasma fraction), 또는 자가 혈청(autologous serum)이 이용될 수 있다. MSC를 내포하는 용액은 혼합되고 대략 10분 동안 얼음 위에서 냉각된다. 대략 1 ml의 DMSO가 동결보존제(cryopreservative)로서 첨가된다. 대안으로, 대략 6% HES 하이드록시에틸 전분과 대략 5% DMSO의 대략 1 ml 혼합물이 냉동보존제로서 이용될 수 있다. 생성된 용액은 냉동바이알 내로 분취된다. 대안으로, 생성된 용액은 동결보존에 적합한 임의의 용기, 예를 들면, 동결보존 가방 내로 분취될 수 있다. 냉동바이알은 이후, 본 명세서에 더욱 상세하게 기술된 바와 같은 본 발명의 프로그램(controlled rate) 냉동 장치 프로토콜에 따라 프로그램(controlled rate) 냉동 장치(Cryomed)에서 동결보존된다. MSC를 내포하는 용액이 대략 -90℃의 표적 온도에 도달하면, 냉동바이알은 장기 저장 냉동 장치로 이전되고 대략 -135℃ 이하에서 저장된다. 대안으로, 냉동바이알 또는 다른 적합한 동결보존 용기는 모니터 덤프-냉동기(monitored dump-freeze) 내에 배치되고 대략 -80℃로 냉각되고, 이후 대략 -135℃ 이하에서 장기 저장 냉동 장치 내에 증기 상태의 액화 질소 내로 이전될 수 있다.

<217> 대안으로, 본 발명의 방법에 따라 배양 플라스크(culture flask)를 접종하고 세포를 배양하는데 양성 분획물이 이용될 수 있다. 그다음, MSC가 본 발명의 방법에 따라 세포 배양액으로부터 선택되고 동결보존될 수 있다.

<218> 본 발명에 따라 획득된 세포는 CD117 선택이 이용되는 본 발명의 실시 동안 임의의 시점에서 다른 적절한 공정과 방법에 의해 선택되거나 분리될 수 있다. 가령, 본 명세서에 기술된 CD117 선택 공정과 방법을 이용하는 대신에, 동결보존 이전, 해동 이후, 또는 세포 배양으로부터 획득된 본 발명의 세포는 적절한 온도와 조건에서 대략 2주 내지 대략 4주 또는 다른 적절한 기간 동안 배양에서 혈청 기아 배지(serum deprivation media)를 이용한 혈청 기아(serum deprivation)에 의해 농축될 수 있다. 혈청 기아 배지는 ES-FBS와 함께 또는 ES-FBS 없이 이용될 수 있다.

<219> 세포 배양을 위한 준비

<220> 본 발명의 방법에 따라 수집된 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액은 추가의 선택 단계, 동결보존, 또는 치료 또는 화장 용도에 대비하여 더욱 배양될 수 있다. 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액은 본 발명에 따른 농축 이후에, 또는 동결보존과 해동 이후에, 세포 배양에 대비될 수 있다. 적용가능한 경우에, 해동 단계는 해동되는 대략 5 ml의 동결보존된 세포를 내포하는 각 바이알에 대하여 대략 15 ml 분취량의 밀도 구배 배지(Histopaque, Sigma-Aldrich) 또는 다른 적절한 배지를 대략 실온에서 준비하고, 이후, 해동되는 대략 5 ml의 동결보존된 세포를 내포하는 각 바이알에 대하여 대략 25 ml 분취량의 Chang 완전 배지(complete media), DMEM 완전 배지, 또는 IMDM 완전 배지 또는 다른 적절한 배지를 준비하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 처리후, 밀도 구배, 그리고 세포 선택으로부터 새로운 세포 시료 역시 배양액에 접종될 수 있다.

<221> Chang 완전 배지는 제품 12571-063으로서 대략 325 ml의 MEM 알파 배지(Gibco)를 포함하고 20% Chang 배지가 첨가되어 대략 90 ml의 Chang B(기초) C110(18% v/v)(Irvine Scientific), Supplement C106(2% v/v)(Irvine Scientific)으로부터 대략 10 ml의 Chang 배지 C, 대략 5 ml 페니실린/스트렙토마이신(0.85% 염수에서 10,000 unit/ml 페니실린 G 나트륨과 10,000 µg/ml 스트렙토마이신 황산염으로 제조된 액체)(Gibco-15140-122), 대략 5 ml의 L-글루타민 200 mM(100X)(Gibco-25030-081), 대략 75 ml의 ES-소 태아 혈청(15% v/v)(Gibco-10439-024)을 내포한다. Chang 배지는 완전 배지(Irvine Scientific)로서 구입될 수 있다.

<222> 동결보존된 세포는 완전 배지, DNase(Genentech, Inc. #50242-100-40), TrypLE™ Express(Gibco, #12605-010)와 DPBS(Mediatech, MT21-031 CV)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 물질을 이용하여 해동될 수 있다.

<223> 동결보존된 세포는 증기 상태의 액화 질소에서 저장으로부터 이동되고 37°C 수조 내에 배치되어야 한다. 세포는 수조 내에서 교반되고 완전히 해동되지 않도록 한다. 부분적으로 해동된 세포는 DNase를 내포하는 냉각된 완전 Chang 배지로 이전되고, 반전에 의해 혼합될 수 있다. DNase는 100 ml의 Chang 배지당 대략 10 방울로 첨가될 수 있다. 대략 5 ml 세포 제조물이 각각 대략 25 ml의 냉각된 Chang 배지에 첨가될 수 있다. 현탁액은 대략 5분 동안 대략 120 g에서 원심분리될 수 있다. 상층액은 흡출되고, 세포는 세포 배양에 대비하여 적절한 배지에서 재현탁될 수 있다.

<224> 대안으로, 해동이 불필요하면, 예를 들면, 월경 줄기 세포를 포함하는 세포 현탁액이 동결보존 단계의 부재에서 배양되면, 세포 현탁액은 Pulmozyme으로부터 구입가능한 대략 1 mg의 DNase를 내포하는 대략 25 ml 분취량의 냉각된 Chang 완전 배지로 대략 5 ml 분취량을 배치함으로써 희석될 수 있다.

<225> 희석된 세포 현탁액은 반전에 의해 혼합될 수 있다. 현탁액은 대략 7분 동안 대략 840 g에서 원심분리된다. 상층액은 펠릿을 교란하지 않으면서 흡출된다. 펠릿은 Chang 완전 배지로 대략 30 ml의 전체 부피가 된다. 혈구계로 세포 계수, 그리고 트리판 블루(trypan blue)를 이용한 생존능 검사 또는 다른 적절한 생존능 검사 방법을 비롯한 분석을 위하여 소량의 세포 현탁액이 이전된다. 대략 30 ml 현탁액이 밀도 구배 용액(Histopaque, Sigma-Aldrich) 또는 다른 적절한 배지에 발라지고, 브레이크 없이 대략 30분 동안 대략 420 g에서 원심분리된다. 튜브는 연막(buffy coat)을 교란하지 않으면서 원심분리로부터 이동된다. 상층액은 흡출되고, 연막(buffy coat)은 수집된다. 연막(buffy coat)은 Chang 완전 배지로 대략 20 ml가 되고, 대략 7분 동안 대략 840 g에서 원심분리된다. 상층액은 흡출되고, 펠릿은 Chang 완전 배지에서 대략 10 ml까지 현탁되지만, 대략 20 ml 또는 대략 30 ml, 또는 심지어 대략 10 ml 미만일 수도 있다. 세포 계수와 생존능 분석을 수행하기 위하여 현탁액의 분취량, 예를 들면, 대략 100 µl가 이전된다.

<226> 동결보존된 세포의 배양

<227> 세포는 대략 48 시간 계대 시간(passage time)으로 대략 2000개 세포/cm²으로 도달될 수 있다. 더욱 높은 농도의 세포가 이용되면, 계대는 대략 24 시간 간격으로 진행될 수 있다. 비-조직 배양 처리된 T75 플라스크는 대략 15 ml의 완전 배지에서 대략 150,000개 세포를 도달하는데 이용될 수 있다. 도달된 세포는 대략 80% 증식정도(subconfluency)까지 5% CO₂ 배양기에서 배양될 수 있다.

<228> 세포는 다수의 계대가 수행될 수 있다. 세포가 플라스크로부터 쉽게 이탈되면, 플라스크로부터 배지가 흡출될 수 있다. 플라스크는 이후, 칼슘 또는 마그네슘이 없는 대략 5 ml의 인산염 완충된 용액(PBS)으로 씻겨질 수 있다. 그 다음, 부착된 세포가 1회 세척된 이후에 PBS가 제거될 수 있다. 대략 37°C에서 미리 데워진 대략 2 ml의 트립신(Trypsin)-유사 효소 또는 다른 적절한 효소 용액이 T75 플라스크(T25 플라스크의 경우에 1 ml)에 첨가될 수 있다. 플라스크는 세포를 효소-유사 용액으로 코팅하기 위하여 교반될 수 있다. 효소-유사 용액을 내포하는 플라스크는 배양기 내에서 대략 37°C에서 대략 5분 동안 배양될 수 있다. 배양후, 플라스크는 세포가 이동하도

록 고품 표면을 가볍게 두드려준다. 플라스크의 내용물은 반응물을 씻어내고 반응을 중단시키기 위하여 대략 2 ml의 완전 배지로 희석될 수 있다. 세포는 대략 2 ml 내지 대략 5 ml DPBS로 세척되고 50 ml의 세척용 원심분리 튜브로 이전될 수 있다. 튜브는 대략 5분 동안 대략 120 g에서 원심분리될 수 있다. 상층액은 원심분리 이후에 폐기되고, 수확된 세포는 Chang 완전 배지에서 현탁될 수 있다. T25 플라스크에서 배양을 위하여 대략 7 ml의 세포 현탁액이 이용되고, T75 플라스크에서 배양을 위하여 대략 15 ml의 세포 현탁액이 이용될 수 있다.

<229> 세포 배양을 위한 Chang 완전 배지는 대략 325 ml의 MEM 알파 배지(Gibco #12571-063), 대략 90 ml의 Chang B (기초 배지)(18% v/v)(Irvine Scientific, C110), 대략 10 ml의 Chang C(2% v/v)(Irvine Scientific, Supplement C106), 대략 5 ml 페니실린/스트렙토마이신(10,000 unit/ml 페니실린 G 나트륨 & 10,000 µg/ml 스트렙토마이신 황산염(Gibco #15140-122)), 대략 5 ml의 L-글루타민 200 mM (100X)(Gibco, #25030-081), 대략 75 ml의 ES-소 태아 혈청(15% v/v)(Gibco #10439-024)을 포함한다.

<230> 해동과 배양 방법의 대안적 구체예

<231> 세포를 액화 질소 증기로부터 이동시킨 이후, 세포가 완전하게 해동되지 않도록 하면서 37°C 수조 내에서 냉동 바이알을 교반한다. 부분적으로 해동된 세포는 DNase를 내포하는 냉각된 Chang 배지로 이전되고 반전에 의해 부드럽게 혼합될 수 있다. 각 5 ml의 세포 현탁액에 대하여, 대략 25 ml의 냉각된 Chang 배지가 이용될 수 있다. 100 ml의 냉각된 Chang 배지에 대략 10 방울로 DNase가 Chang 배지에 첨가될 수 있다. 세포 현탁액은 대략 5분 동안 대략 120 g에서 원심분리될 수 있다. 상층액은 흡출되고, 세포는 앞서 기술된 항생제 배지 내에 배치될 수 있다. 대략 37°C에서 대략 최소한 12 시간 배양후, 세포는 Chang 완전 배지를 이용하여 세척될 수 있다.

<232> 세척된 세포는 이후, 세포 배양을 위하여 접종될 수 있다. 한 구체예에서, 해동된 세포는 cm²당 대략 40,000개 세포 또는 T-25당 1 백만개 세포로 도말될 수 있다. 세포는 48 시간 계대 시간으로 cm²당 2000개 세포로 도말될 수 있다. 더욱 많은 세포가 도말되면, 계대는 대략 24 시간 간격으로 진행될 수 있다. 비-조직 배양 처리된 T75 플라스크는 대략 15 ml의 완전 배지에서 대략 150,000개 세포를 도말하는데 이용될 수 있다. 세포는 대략 80% 증식정도(subconfluency)까지 5% CO₂ 배양기에서 배양될 수 있다. 세포가 플라스크로부터 쉽게 이탈되면, 플라스크로부터 배지가 흡출될 수 있다. 플라스크는 이후, 칼슘 또는 마그네슘이 없는 대략 5 ml의 인산염 완충된 용액(PBS)으로 씻겨질 수 있다. 그 다음, 부착된 세포가 최소한 1회 세척된 이후에 PBS가 제거될 수 있다. 대략 37°C에서 미리 데워진 대략 2 ml의 트립신(Trypsin)-유사 효소가 T75 플라스크(T25 플라스크의 경우에 1 ml)에 첨가되고, 플라스크는 세포를 상기 효소로 코팅하기 위하여 교반될 수 있다. 상기 효소를 내포하는 플라스크는 배양기 내에서 대략 37°C에서 대략 5분 동안 배양될 수 있다. 배양후, 플라스크는 세포가 이동하도록 고품 표면을 가볍게 두드려준다. 플라스크의 내용물은 반응물을 씻어내고 반응을 중단시키기 위하여 대략 2 ml의 완전 배지로 희석될 수 있다. 세포는 대략 2 ml 내지 대략 5 ml DPBS로 세척되고, 재현탁된 세포는 50 ml의 세척용 원심분리 튜브로 이전될 수 있다. 튜브는 대략 5분 동안 대략 120 g에서 원심분리될 수 있다. 상층액은 원심분리 이후에 폐기되고, 수확된 세포는 Chang 완전 배지에서 현탁되고 차기 계대에 이용될 수 있다. T25 플라스크에서 배양을 위하여 대략 7 ml의 세포 현탁액이 이용되고, T75 플라스크에서 배양을 위하여 대략 15 ml의 세포 현탁액이 이용될 수 있다.

<233> 다른 세포 배양 방법

<234> 현탁액 내에서 세포는 처리되지 않은 배양 플라스크 내에 Chang 완전 배지, DMEM 완전 배지(높은 글루코오스 또는 낮은 글루코오스 포함), 또는 다른 적절한 배지 내로 cm²당 대략 40,000개 세포로 접종될 수 있다. 플라스크는 대략 37°C의 온도에서 대략 5% CO₂에서 CO₂ 배양기(Thermo Electron Corp. 또는 Bioscience Technologies), 또는 임의의 다른 적절한 배양기 시스템 내에서 배양될 수 있다. 세포 배양액은 탁도(turbidity)와 pH 변화가 모니터링된다. pH가 높으면, 대략 50%의 배지가 교체되어야 한다.

<235> 플라스크는 초기에 대략 7일 동안, 또는 배지가 이러한 배지 내에서 페놀 레드(phenol red) 지시약(indicator)의 색깔에 의해 범위에서 현저한 벗어남이 확인될 때까지 배양될 수 있다. pH가 대략 7일후 여전히 안정하면, 배지는 필요에 따라, 새로운 배지(본 명세서에서, "처녀 배지(virgin media)")로 교체된다. 거의 모든 배지가 교체된다. 7일 시점에 배지 교체후, 세포는 8일 내지 21일까지 함유될 수 있다. 대략 70-80% 합류(confluence)가 달성되면, 세포는 계대배양될 수 있다. 세포 배양은 트립신-유사 효소, 예를 들면, TrypLE™ Express(Gibco), 또는 본 발명에 따른 세포 선택을 수행하기 위한 충분한 세포를 제공하는 임의의 다른 적절한 효소를 이용하여 계대배양된다. 가령, 세포 선택은 대략 10 백만개 세포로 수행될 수 있다. 세포 선택은 또한, 대략 10 백만개 초과 또는 미만의 세포로 수행될 수 있다.

- <236> 본 발명에 따르면, 세포는 적절한 시점에 세포 배양액으로부터 수집될 수 있다. 세포를 수집하기 위하여, 유착 세포는 플라스크로부터 분리되어야 한다. 플라스크로부터 세포를 분리하기 위하여, 배지는 자동화 피펫을 통하여 흡출된다. 플라스크는 이후, 칼슘 또는 마그네슘이 없는 대략 5 ml의 인산염 완충된 염수(PBS)로 씻겨진다. 그 다음, 부착된 세포가 최소한 1회 세척된 이후에 PBS가 제거된다. 가급적, 대략 37℃에서 미리 데워진 대략 1 ml의 트립신-유사 제조합 효소, 예를 들면, TrypLE™ Express(Gibco), 또는 임의의 다른 적절한 효소가 플라스크 내에 세포 배양액에 첨가된다. 플라스크는 세포를 상기 효소로 코팅하기 위하여 교반된다. 상기 효소를 내포하는 플라스크는 대략 37℃에서 대략 5분 동안 배양된다. 배양후, 플라스크는 세포가 이동하도록 고형 표면을 가볍게 두드려준다. 플라스크는 대략 2 ml의 Chang 완전 배지로 희석되고, 세포는 Chang 완전 배지, DMEM 완전 배지(높은 글루코오스 또는 낮은 글루코오스 포함), 또는 다른 적절한 배지로 세척을 위하여 15 ml 원심분리 튜브로 이전된다. 튜브는 대략 7분 동안 대략 100 g에서 원심분리된다. 상층액은 흡출되고 폐기된다. 펠렛은 적절한 부피의 Chang 완전 배지, DMEM 완전 배지(높은 글루코오스 또는 낮은 글루코오스 포함), 또는 다른 적절한 배지에서 현탁된다.
- <237> 이 시점에서, 세포는 본 발명의 세포 선택 방법에 따라 세포 배양액으로부터 선택될 수 있다. 일단 선택된 세포는 Petri 접시에 도말되거나, 배양 플라스크 내로 접종되거나, 또는 본 발명에 따라 동결보존될 수 있다.
- <238> 세포는 Chang 완전 배지(대략 15% FBS)를 이용하여 9 cm² Petri 접시에 도말될 수 있다. 대안으로, 세포는 구멍 뚫린 뚜껑이 달린 배양 플라스크 내에 배치될 수 있다. 배지의 pH가 높아지면, 세포는 Chang 완전 배지로 세척될 수 있다. 적절한 성장후 필요하면, 세포는 트립신-유사 효소를 이용하여 Petri 접시 또는 배양 플라스크로부터 분리되고, 이후 Chang 완전 배지를 이용하여 처리되지 않은 배양 플라스크 내에 배치될 수 있다. 적절한 성장후, 세포는 트립신-유사 효소, 예를 들면, TrypLE™ Express(Gibco)를 이용하여 분리되고, 이후 새로운 처리되지 않은 배양 플라스크에 접종될 수 있다. 이러한 공정은 원하는 세포 성장을 유지하기 위하여 반복될 수 있다. 세포는 배지의 pH가 높으면 새로운 배지로 세척되거나, 또는 대략 50% 또는 다른 적절한 양의 배지가 새로운 배지로 교체될 수 있다. 이 시점에서, 세포는 본 발명의 세포 선택 방법에 따라 세포 배양액으로부터 선택될 수 있다. 선택된 세포는 Petri 접시에 도말되거나, 배양 플라스크 내로 접종되거나, 또는 본 발명에 따라 동결보존될 수 있다.
- <239> 미국 연방 규정(Code of Federal Regulation)에 따라서 미국 식품의약국(United States Food and Drug Administration)에 의해 확립된 현행 우수 제조 관리기준(current Good Manufacturing Practice, cGMP)과 우수 인체조직 관리기준(current Good Tissue Practice, cGTP)이 본 발명의 실시 동안 준수된다.
- <240> 본 발명의 공정, 방법과 시스템의 상기한 단계는 도 2 내지 28에 예시된 바와 같이 대안적으로 구현될 수 있다.

실시예

- <241> **M2-01 세포**
- <242> 한 실험에서, 월경 줄기 세포는 본 발명의 실시예에 따라 수집되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-01로 명명된 대략 0.4 ml의 월경 흐름 시료가 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 대략 0.4 ml의 월경 흐름 시료가 수집 장치로부터 수집 튜브 내에 대략 10 ml의 수집 배지 내로 부어졌다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드가 없는 DPBS(Mediatech), 대략 100 unit/ml에서 페니실린, 대략 100 µg/ml에서 스트렙토마이신, 그리고 DPBS ml당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 헤파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 수집 용기 내에 얼음 위에서 포장되고, 운송에 의해 처리 시설로 수송되었다.
- <243> 월경 흐름 시료는 수집후 대략 24 시간 이내에 처리 시설에 도착하였다. 항생제를 내포하는 수집 배지 내에 대략 10.0 ml의 월경 흐름 시료를 포함하는 수집 용기는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18℃의 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 호기성과 혐기성 미생물에 대하여 음성이었다.
- <244> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠렛은 대략 2 ml의 DPBS에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 위하여 분석되었다. 혈구계를 이용하여 수행된 전체 세포 계수(total cell count)는 처리후 시료에서 대략 7.5 백만개 세포가 수집됨을 지시하였다. 유동

세포 분석은 처리후 시료 내에 월경 줄기 세포 상에 존재하는 특정의 세포 표면 마커를 확인하는 FC500 유동 세포 분석기를 이용하여 본 발명의 방법에 따라 수행되었다. 도 29a 내지 29j에 도시된 바와 같이, 이로부터 결과는 CD117+ 세포가 세포 개체군의 대략 0.4% 농도로 수집됨을 지시하였다. 부가적으로, 이들 결과는 CD45 음성 세포가 세포 개체군의 대략 58% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 CD44+ 세포가 세포 개체군의 대략 17% 농도로 수집되고, CD166+ 세포가 세포 개체군의 대략 3% 농도로 수집되고, CD105+ 세포가 세포 개체군의 대략 8.0% 농도로 수집되고, CD90+ 세포가 세포 개체군의 대략 6.8% 농도로 수집되고, CD29+ 세포가 세포 개체군의 대략 0.1% 농도로 수집되고, CD34+ 세포가 세포 개체군의 대략 0.1% 농도로 수집됨을 지시하였다. 유동 세포 분석은 또한, 세포 생존능을 평가하기 위하여 7AAD를 이용하여 수행되었다. 이로부터 결과는 월경 줄기 세포가 대략 95%가 생존함을 지시하였다.

<245> 남아있는 세포 현탁액은 본 발명의 방법에 따라 배양되었다. 특히, 세포 현탁액의 일부는 1.083 g/ml로 15 ml의 밀도 구배 용액(Histopaque, Sigma-Aldrich)에 덮어 씌워졌다. 세포 현탁액은 브레이크 없이, 대략 30분 동안 대략 420 g에서 원심분리되었다. 상층액은 흡출되고, 연막(buffy coat)은 이전되고 튜브 내에 배치되었다. 전체 부피가 대략 30 ml가 되도록 Chang 완전 배지가 연막에 첨가되었다. 용액은 대략 7분 동안 대략 840 g에서 2회 세척되었다. 두 번째 세척에서 원심분리후, 상층액은 제거되고 펠릿이 남겨지는데, 이들 펠릿을 현탁하기 위하여 튜브에 대략 15 ml의 Chang 완전 배지가 첨가되었다. 대략 100 μ l의 현탁액은 혈구계로 세포 계수 분석과 트리판 블루를 이용한 생존능 분석을 수행하기 위하여 이전되었다.

<246> 대략 1 백만개 세포가 1일에, T25 처리되지 않은 배양 플라스크 내에 Chang 배지로 cm^2 당 대략 40,000개 세포로 접종되었다. 플라스크는 대략 37°C 온도에서 대략 5% CO_2 에서 배양되었다. 8일에, 세포는 계대 1이 진행되고 배지가 교체되었다.

<247> 본 명세서에서, 계대는 일반적으로, 자동화 피펫으로 배지를 흡출함으로써 플라스크로부터 세포를 분리하는 단계를 수반하였다. 플라스크는 칼슘 또는 마그네슘이 없는 대략 5 ml의 인산염 완충된 염수(PBS)로 씻겨졌다. 그 다음, 부착된 세포를 내포하는 플라스크가 1회 세척된 이후에 PBS가 제거되었다. 대략 37°C에서 미리 데워진 대략 1 ml의 트립신(Trypsin)-유사 효소(TrypLETM Express - Gibco)가 플라스크에 첨가되고, 상기 플라스크는 세포를 상기 효소로 코팅하기 위하여 교반되었다. 상기 효소를 내포하는 플라스크는 배양기 내에서 대략 37°C에서 대략 5분 동안 배양되었다. 배양후, 플라스크는 세포가 이동하도록 고정 표면을 가볍게 두드려주었다. 플라스크의 내용물은 대략 2 ml의 완전 배지로 희석되고, 세포는 15 ml의 세척용 원심분리 튜브로 이전되었다. 튜브는 대략 7분 동안 대략 100 g에서 원심분리되었다. 상층액은 원심분리 이후에 폐기되고, 수확된 세포는 Chang 완전 배지에서 현탁되고 최소한 하나의 새로운 T25 또는 T75 처리되지 않은 세포 배양 플라스크 내로 배치되었다.

<248> 세포 배양액의 추가적인 계대는 10일, 14일, 19일, 21일, 24일, 26일, 29일, 32일과 35일에 진행되었다. 8일에, 대략 165,000개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 본 발명의 방법에 따라 접종되었다. 10일에, 대략 270,000개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었다. 14일에, 대략 840,000개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었다. 19일에, 대략 2.2 백만개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었다. 21일에, 대략 5 백만개 세포가 수확되었는데, 이들 중에서 대략 3.5 백만개 세포가 세포 표현형(cell phenotype)에 이용되었다. 24일에, 대략 3.0 백만개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었다. 26일에, 대략 4.9 백만개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었다. 29일에, 대략 14.8 백만개 세포가 수확되고 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었는데, 여기서 대략 11.1 백만개 세포가 CD117을 발현하는 세포의 양성 선택(positive selection)에 이용되고, 대략 3.5 백만개 세포가 표현형 분석에 이용되고, 대략 200,000개 세포가 배양액에 접종되었다. 32일에, 대략 1.3 백만개 세포가 수확되었는데, 이들 중에서 대략 1 백만개 세포가 유동 표현형(flow phenotype)에 이용되고 대략 300,000개 세포가 처리되지 않은 조직 배양 플라스크 내에 Chang 배지에 접종되었다.

<249> 29일에, 앞서 언급된 바와 같이, 배양으로부터 수확된 세포는 본 명세서에 기술된 바와 같은 본 발명의 선택 방법에 따라 CD117 선택이 수행되었다. CD117 줄기 세포 선택에 앞서, 각 세포 배양액의 분취량이 분석을 위하여 이전되었는데, 이로부터 결과는 표 C에 도시된다.

<250> 특히, 수확된 세포는 생쥐 항-인간 CD-117 항체로 표지되었다. 대략 10 백만개의 수확된 세포는 원심분리되고, 상층액이 흡출되었다. 펠릿은 제품 104D2(Santa Cruz)와 함께 대략 5 μ g의 정제된 생쥐 항-인간 CD117 단클론 항체(IgG₁)를 내포하는 대략 100 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다. BD Biosciences로부터 구입가능한 작업 완

충액은 대략 7.2의 pH에서 PBS, 소 혈청 알부민, EDTA와 대략 0.09% 아지드화물을 내포한다. 세포와 항체를 내포하는 용액은 얼음 위에서 대략 20분 내지 대략 25분 동안 배양되었다. 세포는 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 작업 완충액으로 세척되고, 세포와 항체를 내포하는 용액은 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되었다. 원심분리후, 상층액은 흡출되고 폐기되며, 펠릿은 대략 80 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다.

<251> CD117 줄기 세포-항체 복합체는 생쥐 IgG의 중쇄(heavy chain) 및/또는 경쇄(light chain)에 결합할 수 있는 염소 항-생쥐 항체로 표지되었다. 자성 마이크로비드는 염소 항-생쥐 항체에 부착된다. 상기 염소 항-생쥐 IgG 항체는 작업 완충액 내에 현탁된 펠릿에 첨가되고, 대략 30분 내지 대략 35분 동안 얼음 위에서 배양되었다. 배양후, 세포는 대략 2 ml의 작업 완충액으로 세척되고 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되었다. 상층액은 흡출되고, 최종 세포는 대략 500 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다.

<252> 작업 완충액을 비롯하여 수확된 줄기 세포와 용액을 포함하는 세포 현탁액은 세포의 비-특이적인 표지화(labeling)를 예방하기 위하여 실험 동안 차게 유지되었다.

<253> MS 칼럼(Miltenyi Biotec)은 칼럼을 통하여 대략 500 μ l의 작업 완충액을 씻어냄으로써 준비되었다. Miltenyi Biotec로부터 구입가능한 Minimacs가 CD117 줄기 세포 선택에 이용되었다. 상기 칼럼은 Miltenyi Biotec로부터 구입가능한 MACS 분리기의 자기장 내에 배치되었다. 피펫을 통하여 세포 현탁액이 상기 칼럼에 첨가되었다. 표지되지 않은 세포와 작업 용액은 칼럼을 통과하고 표현형확인과 세포 계수 분석을 위하여 무균 튜브 내에 수집되었다. 수집된 유출물을 내포하는 튜브는 음성 CD117 세포 분획물로서 표지되었다. 칼럼은 세포 현탁액을 첨가한 이후에, 작업 완충액으로 3회 세척되었다. 칼럼 아래에 무균 튜브가 배치되었는데, 상기 칼럼은 양성 분획물이 칼럼을 통과하여 무균 튜브 내로 들어갈 수 있도록 자기장으로부터 이동되었다. 대략 1 ml의 작업 완충액이 칼럼에 첨가되고, 세포의 양성 분획물이 방출되도록 플런저가 칼럼으로 밀어 넣어졌다. 수집된 유출물을 내포하는 튜브는 양성 CD117 세포 분획물로서 표지되었다.

<254> 양성 및 음성 분획물은 생존 세포의 총수를 획득하기 위하여 혈구계로 분석되었다. 음성 분획물은 유동 세포 분석으로 분석되었다. M2-01 세포는 처리와 배양 동안 다양한 단계에서 분석되었는데, 이로부터 결과는 도 30a 내지 30e에 도시되고 아래의 표 C에 요약된다:

표 C

M2-01 유동 세포 분석과 배양

Passage #	CD117-PE	CD44-FITC (POS)	CD45-ECF (NEG)	7AAD-TEST	7AAD-ISO	CD166	CD105	CD29	CD34	CD90
M2-01 P0	0.40%	17.70%	58.90%	95.40%	95.10%	3.70%	8.00%	0.10%	0.10%	6.80%
M2-01 P4	40.30%	88.30%	77.10%	97.50%	97.50%	94.70%	16.10%	81.10%	0.10%	84.90%
M2-01 P7	2.10%	89.20%	87.70%	95.20%	95.60%	91.00%	33.00%	82.90%	0.20%	67.90%
M2-01 P8	2.50%	70.80%	94.50%	97.30%	95.30%					
M2-01 POS FRAC	7.20%	93.60%	83.30%	95.80%	91.90%					
M2-01 NEG FRAC	4.50%	94.10%	86.40%	94.70%	92.80%	92.00%	45.60%	90.40%	0.10%	79.60%

<255>

<256> M2-02C 세포

<257> 다른 실험에서, 월경 줄기 세포는 본 발명의 실시예에 따라 수집되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-02C로 명명된 대략 1.0 ml 이하의 월경 흐름 시료가 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 월경 흐름 시료가 수집 장치로부터 수집 튜브 내에 대략 10 ml의 수집 배지 내로 부어졌다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드와 없는 DPBS(Mediatech), 대략 100 unit/ml에서 페니실린, 대략 100 μ g/ml에서 스트렙토마이신, 그리고 DPBS ml당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 헤파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 수집 용기 내에 얼음 위에서 포장되고, 운송에 의해 처리 시설로 수송되었다.

<258> 월경 흐름 시료는 수집후 대략 24 시간 이내에 처리 시설에 도착하였다. 항생제를 내포하는 수집 배지 내에 대략 10.0 ml의 월경 흐름 시료를 포함하는 수집 용기는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18℃의 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic

culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 호기성과 혐기성 미생물에 대하여 음성이었다.

<259> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠렛은 대략 2 ml의 완충된 염수에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 달성하기 위하여 유동 세포 분석에 의해 분석되었다.

<260> 처리 시료의 전체 세포 계수(total cell count)는 혈구계를 이용하여 수행되었다. 상기 처리 시료에서 대략 19.7 백만개 세포가 수집되었다. 유동 세포 분석은 FC500 유동 세포 분석기를 이용하여 세포 표면 마커를 확인하기 위하여 수행되었다. 도 31a 내지 31iii에 도시된 바와 같이, 이로부터 결과는 CD117⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 0.2% 농도로 수집됨을 지시하였다. 부가적으로, 이들 결과는 CD45 음성 세포가 세포 개체군의 대략 97% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 CD44⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 1% 농도로 수집되고, CD166⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 0.1% 농도로 수집되고, CD105⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 1% 농도로 수집되고, CD90⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 0.4% 농도로 수집되고, CD29⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 0.5% 농도로 수집되고, CD34⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 0% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이로부터 결과는 또한, 7AAD에 의한 측정에서, 수집된 세포의 대략 99%가 생존함을 지시하였다.

<261> 모든 현탁된 세포는 하나의 50 ml 삼각 수집 튜브로 이전되고, 세포 현탁액의 부피는 세척 용액을 이용하여 대략 31 ml의 전체 부피로 되었다. 30 ml의 세포 현탁액 중에서 대략 절반은 밀도 구배 원심분리에 의해 농축되었다. 세포는 밀도 구배 원심분리와 부피 감소, 농축과 세척을 비롯한 방법에 의해 처리되었다. 세포 현탁액은 대략 30 ml로 되고 대략 15 ml의 림프구 분리 배지(대략 20℃에서 밀도 1.077 - 1.080 g/ml - Cellgro)의 밀도 구배가 밀에 놓였다. 세포 현탁액과 밀도 구배는 대략 20℃의 온도에서 브레이크 없이, 대략 30분 동안 대략 14,000 rpm으로 원심분리되었다. 백혈구 혈소판층이 형성되고 월경 줄기 세포 집단을 내포하였다. 백혈구 혈소판층 위에서 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 백혈구 혈소판층은 일부 세척 용액과 함께, 가능한 적은 부피의 밀도 구배로서 이전되었다. 적혈구세포를 내포하는 남아있는 밀도 구배와 펠렛은 폐기되었다.

<262> 백혈구 혈소판층은 50 ml 삼각 수집 튜브 내에 배치되고, 부피는 세척 용액으로 대략 30 ml가 되었다. 세포 현탁액은 대략 20℃의 실온에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되었다. 원심분리후, 삼각 수집 튜브의 정상 부근에서 대략 1 ml의 상층액이 이전되고 BacT/Alert 혈액 배양 병을 접종하는데 이용되었다. 상기 혈액 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 상층액과 세포 현탁액이 임의의 호기성 또는 혐기성 미생물을 내포하지 않음을 지시한다. 남아있는 상층액은 월경 줄기 세포를 포함하는 펠렛이 남아있도록 조심스럽게 흡출되었다.

<263> T25 처리되지 않은 배양 플라스크 내에 15% Chang 완전 배지 내로 대략 1 백만개 세포가 cm²당 대략 40,000개 세포로 접종되었다. 플라스크는 37℃ 온도에서 대략 5% CO₂에서 배양되었다. 세포는 6일에 계대 1에서 대략 80,000개, 11일에 324,000개, 17일에 600,000개, 9일에 2.9 백만개(세포 표현형의 경우에 제공된 2.3 백만개), 22일에 1.2 백만개, 24일에 2.6 백만개, 29일에 26.8 백만개(세포 표현형의 경우에 3.5 백만개, CD117 선택의 경우에 10 백만개, 동결보존된 131 백만개, 배양을 위하여 접종된 200,000개 세포)가 수확되었다. 세포와 배지의 분취량은 표현형확인과 타당성 검증(validity assessment)을 위하여 세포 배양 동안 수집되었다. 표현형 확인과 타당성 검증은 모든 세포주에 관련하여, 모든 세포 배양 실험에 대하여 본 명세서에 기술된 방법에 따라 수행되었다. 세포 배양 동안 세포 계수는 모든 세포주에 관련하여, 혈구계를 이용하여 수행되었다. 이러한 검증으로부터 수집된 데이터는 세포주 M2-02C가 초기에, CD117, CD166, CD105, CD29, CD90과 CD44에 대하여 양성이고, 그리고 높은 비율의 생존능을 갖는 CD45에 대하여 음성임을 증명하였다.

표 D

세포 배양 동안 M2-02C에 대한 유동 세포 분석 결과

Passage #	CD117- PE	CD44- FITC (POS)	CD45- EGD (NEG)	7AAD- TEST	CD105	CD 29	CD 34	CD 90	CD166
M2-02A	0.2%	0.6%	96.7%	98.9%	1.1%	0.3%	0.0%	0.0%	0.6%
M2-02B	0.2%	0.9%	93.2%	98.4%	2.3%	1.0%	0.0%	0.5%	1.2%
M2-02C	0.1%	0.5%	98.0%	99.5%	0.9%	0.5%	0.1%	0.4%	0.2%
M202 P3	15.5%	97.1%	99.9%	99.0%	96.0%	97.3%		67.0%	95.8%
M202 P5	5.9%	97.1%	100.0%	91.1%	47.9%	97.7%			
M2-02C P6		96.3%	88.8%	99.5%	86.6%	92.2%	10.3%	81.8%	94.8%
M2-02C P7	14.6%	95.9%	84.3%	99.3%	92.4%	95.1%	18.9%	91.5%	93.4%
M2-02C P8	6.3%	98.1%	97.4%	99.4%	52.2%	90.4%	0.5%	83.2%	98.2%
M2-02C-P9	12.7%	97.5%	90.8%	99.2%					
M2-02C P10	12.7%	97.6%	91.5%	99.0%					
M202C P11	34.9%	97.3%	72.6%	98.7%					
M202C P12	24.6%	96.7%	87.3%	98.9%	93.7%	98.3%	10.7%	90.0%	91.8%
M2-02C P14	21.1%	97.8%	60.5%	98.2%	95.7%	98.0%	21.2%	88.3%	95.7%
M2-02C-P17	35.1%	92.0%	75.0%	95.9%	84.0%	91.0%	37.6%	96.0%	98.8%
M2-02C P18	18.4%	88.8%	70.1%	98.1%					
M2-02C P19	14.9%	92.1%	67.1%	97.1%					
M202C-P21	16.5%	89.5%	70.8%	98.6%					
M202C P26	40.1%	82.2%	40.1%	92.9%					
M2-02C P28	14.9%	78.5%	72.7%	94.9%					
M2-02C-P3 thaw	37.4%	89.6%	86.6%	97.5%					
M202C THAW P4			100.0%	99.7%	98.4%	98.7%			92.9%
M202C- THAW-P6	10.6%	97.6%	99.8%	98.1%	96.4%	97.2%			88.2%
M2-02C FICOL P4	0.0%	90.1%	82.0%	99.1%					
M2-02C FICOL-P8	21.4%	91.6%	84.4%	97.4%	94.2%	91.1%	13.0%	88.8%	94.1%
M2-02C FICOL-P9	9.7%	95.2%	97.2%	98.3%					
M2-02C- FICOL-P10	13.8%	92.3%	89.0%	98.0%					
M2-02C FICOL P12	12.3%	90.5%	94.2%	99.0%					
M2-02C P13 FICOL	5.4%	88.9%	79.1%	94.8%					77.8%
M2-02C FICOL P14	23.3%	94.3%	69.9%	98.6%					
M2-02C P15	20.2%	92.3%	73.7%	98.4%	32.0%	95.5%	10.4%	94.9%	85.3%

FICOL									
M2-02C-P18 FICOL	0.0%	89.0%	67.5%	98.5%	28.8%	94.0%	21.3%	95.6%	65.7%
M202C P21 FICOL	4.9%	85.9%	57.0%	96.6%	90.3%	92.3%	28.7%	88.1%	75.4%
M202C FICOL P26	18.0%	67.9%	50.3%	90.1%	20.0%	74.6%	39.7%	57.3%	38.3%
M202C FICOL P28	0.2%	65.7%	69.3%	93.7%					
M2-02C FICOL NEG	17.4%	98.4%	89.8%	99.0%	84.6%	89.5%	19.7%	95.6%	86.4%
M2-02C FICOL POS	13.7%	89.1%	66.3%	92.2%					78.4%
M2-02C FICOL POS					97.9%	97.1%	8.0%	90.7%	
M2-02C-FICOL-P5 POS	0.0%	78.0%	98.4%	89.1%					
M2-02C-P9 FICOL POSITIVE	1.7%	87.5%	67.1%	95.9%					
M2-02C-P10 FICOL POS	14.8%	93.2%	69.7%	98.8%					
M202C-P12 POS FICOL	29.0%	93.5%	74.0%	97.4%					
M2002C P13 POSI-FICOL	2.8%	90.6%	65.5%	98.7%					
M202-P14 FICOL POS					91.0%	92.7%	13.6%	66.4%	80.3%
M202C FICOL P17 POS	34.4%	82.9%	39.0%	93.5%					
M2-02C-P18 POS FICOL POS FXN	0.0%	69.7%	68.9%	94.8%					
M2-02C-P19 POS FICOL	14.4%	93.5%	57.8%	99.0%					
M2-02C P2 POS			87.3%	98.8%	86.9%	94.5%	14.3%	87.7%	89.6%
M2-02C-P3 POS	5.1%	82.6%	93.8%	99.0%					92.6%
M2-02C P4 POS		97.6%	99.1%	98.7%					
M2-02C-P5 POS	10.1%	96.0%	74.0%	99.4%	98.0%	97.4%	4.7%	82.6%	89.5%
M2-02C-P7 POS	3.8%	92.3%	79.4%	99.2%					
M2-02C-P8 POS	5.4%	90.0%	66.5%	96.5%	93.2%	91.3%	24.2%	91.6%	76.6%
M202C-P11 POS	23.6%	89.6%	79.1%	97.1%					
M202C-P15 POS FRAC	12.2%	83.9%	85.8%	95.5%	84.5%	85.7%	16.2%	81.2%	73.6%
M2-02C NEG	17.8%	93.4%	77.3%	97.8%	99.0%	98.3%	96.9%	94.9%	96.1%

<265>

<266>

계대 4에서 배양된 M2-02C에 대한 유동 세포 분석의 결과는 도 32a 내지 32iii에 도시된다. 배양된 시료는 본 발명에 따라 집종된 대략 1 백만개 세포를 포함한다. 이들 결과는 계대 4에서, CD117+ 세포가 세포 개체군의 대략 0.0% 농도로 수집되었다. 부가적으로, 이들 결과는 CD45- 세포가 세포 개체군의 대략 82% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 CD44+ 세포가 세포 개체군의 대략 93% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 또한, 수집된 세포의 대략 99%가 7AAD에 의한 측정에서 생존함을 지시하였다. M2-02C에 대한 계대 8에서 결과는 CD117+ 세포가 세포 개체군의 대략 14% 농도로 수집됨을 지시하였다. 부가적으로, 이들 결과는 CD45- 세포가 세포 개체군의 대략 84% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 CD44+ 세포가 세포 개체군의 대략 93.3% 농도로 수집되고, CD166+ 세포가 세포 개체군의 대략 93% 농도로 수집되고, CD105+ 세포가 세포 개체군의 대략 90% 농도로 수집되고, CD90+ 세포가 세포 개체군의 대략 87% 농도로 수집되고, CD29+ 세포가 세포 개체군의 대략 85% 농도로 수집되고, CD34+ 세포가 세포 개체군의 대략 0.2% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 또한, 수집된 세포의 대략 97%가 7AAD에 의한 측정에서 생존함을 지시하였다.

<267>

세포 배양 동안 이들 세포는 본 명세서에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법에 따라 계대 4에서 CD117 줄기 세포 선택이 수행되었다. 수확된 세포는 생쥐 항-인간 CD-117 항체로 표지되었다. 대략 10 백만개의 수확된 세포는 원심분리되고, 상층액은 흡출되었다. 펠렛은 제품 104D2(Santa Cruz)와 함께 대략 5 μ g의 정제된 생쥐 항-인간 CD117 단클론 항체(IgG₁)를 내포하는 대략 100 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다. BD Biosciences로부터 구입가능한 작업 완충액은 대략 7.2의 pH에서 PBS, 소 혈청 알부민, EDTA와 대략 0.09% 아지드화물을 내포한다. 세포와 항체를 내포하는 용액은 얼음 위에서 대략 20분 내지 대략 25분 동안 배양되었다. 세포는 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 작업 완충액으로 세척되고, 세포와 항체를 내포하는 용액은 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되었다. 원심분리후, 상층액은 흡출되고 폐기되며, 펠렛은 대략 80 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었

다.

- <268> CD117 줄기 세포-항체 복합체는 생쥐 IgG의 중쇄(heavy chain) 및/또는 경쇄(light chain)에 결합할 수 있는 염소 항-생쥐 항체로 표지되었다. 자성 마이크로비드는 염소 항-생쥐 항체에 부착된다. 상기 염소 항-생쥐 IgG 항체가 첨가되고, 대략 30분 내지 대략 35분 동안 얼음 위에서 배양되었다. 배양후, 세포는 대략 2 ml의 작업 완충액으로 세척되고 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되었다. 상층액은 흡출되고, 최종 세포는 대략 500 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다.
- <269> 작업 완충액을 비롯하여 수확된 줄기 세포와 용액을 포함하는 세포 현탁액은 세포의 비-특이적인 표지화(labeling)를 예방하기 위하여 실험 동안 차게 유지되었다.
- <270> MS 칼럼(Miltenyi Biotec)은 칼럼을 통하여 대략 500 μ l의 작업 완충액을 씻어냄으로써 준비되었다. Miltenyi Biotec로부터 구입가능한 Minimacs가 CD117 줄기 세포 선택에 이용되었다. 상기 칼럼은 Miltenyi Biotec로부터 구입가능한 MACS 분리기의 자기장 내에 배치되었다. 피펫을 통하여 세포 현탁액이 상기 칼럼에 첨가되었다. 표지되지 않은 세포와 작업 용액은 칼럼을 통과하고 표현형확인과 세포 계수 분석을 위하여 무균 튜브 내에 수집되었다. 수집된 유출물을 내포하는 튜브는 음성 CD117 세포 분획물로서 표지되었다. 칼럼은 세포 현탁액을 첨가한 이후에, 작업 완충액으로 3회 세척되었다. 칼럼 아래에 무균 튜브가 배치되었는데, 상기 칼럼은 양성 분획물이 칼럼을 통과하여 무균 튜브 내로 들어갈 수 있도록 자기장으로부터 이동되었다. 대략 1 ml의 작업 완충액이 칼럼에 첨가되고, 세포의 양성 분획물이 방출되도록 플런저가 칼럼으로 밀어 넣어졌다. 수집된 유출물을 내포하는 튜브는 양성 CD117 세포 분획물로서 표지되었다.
- <271> 양성과 음성 분획물은 밀도 구배, CD117 선택과 차후 배양에 의한 다른 처리 동안 다양한 단계에서 혈구계와 유동 세포 분석으로 분석되었는데, 양성과 음성 분획물에 대한 전반적인 결과는 표 D에 제시되고, 양성 분획물에 대한 전반적인 결과는 하기 표 E에 제시된다.
- <272> **M2-03E 세포**
- <273> 또 다른 구체예에서, 월경 줄기 세포는 본 발명의 실시예에 따라 수집되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-03E로 명명된 월경 흐름 시료가 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 월경 흐름 시료가 수집 장치로부터 수집 튜브 내에 대략 10 ml의 수집 배지 내로 부어졌다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드가 없는 DPBS(Mediatech), 대략 100 unit/ml에서 페니실린, 대략 100 μ g/ml에서 스트렙토마이신, 그리고 DPBS 배지 ml당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 헤파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 수집 용기 내에 얼음 위에서 포장되고, 운송에 의해 처리 시설로 수송되었다.
- <274> 월경 흐름 시료는 수집후 대략 24 시간 이내에 처리 시설에 도착하였다. 항생제를 내포하는 수집 배지 내에 대략 10.0 ml의 월경 흐름 시료를 포함하는 수집 용기는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18℃의 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 호기성과 혐기성 미생물에 대하여 음성이었다.
- <275> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠릿은 대략 2 ml의 완충된 염수에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 달성하기 위하여 유동 세포 분석에 의해 분석되었다.
- <276> 처리 시료의 전체 세포 계수(total cell count)는 혈구계를 이용하여 수행되었다. 이로부터 결과는 본 발명에 따라, 처리후 시료에서 대략 5.2 백만개 세포가 수집됨을 지시하였다. 유동 세포 분석은 FC500 유동 세포 분석기에서 수행되었다. 이로부터 결과는 CD117⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 0.5% 농도로 수집됨을 지시하였다. 부가적으로, 이들 결과는 CD45 음성 세포가 세포 개체군의 대략 88.4% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 CD44⁺ 세포가 세포 개체군의 대략 2.1% 농도로 수집됨을 지시하였다. 이들 결과는 또한, 7AAD에 의한 측정에서, 수집된 세포의 대략 97.0%가 생존함을 지시하였다.
- <277> 0일에, T75 처리되지 않은 배양 플라스크 내에 Chang 배지 내로 대략 cm²당 대략 40,000개 세포로 접종되었다. 플라스크는 대략 37℃ 온도에서 대략 5% CO₂에서 배양되었다. 10일에 계대 1에서, 배지가 교체되었다. 추가적인

계대가 14일, 16일, 19일, 22일과 26일에 진행되었다. 26일에 계대 5에서, 본 발명의 선택 방법에 따라, CD117 선택을 위하여 세포가 수확되었다.

<278> 수확된 세포는 생쥐 항-인간 CD-117 항체로 표지되었다. 대략 10 백만개의 수확된 세포는 원심분리되고, 상층액은 흡출되었다. 펠릿은 제품 104D2(Santa Cruz)와 함께 대략 5 μ g의 정제된 생쥐 항-인간 CD117 단클론 항체(IgG₁)를 내포하는 대략 100 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다. BD Biosciences로부터 구입가능한 작업 완충액은 대략 7.2의 pH에서 PBS, 소 혈청 알부민, EDTA와 대략 0.09% 아지드화물을 내포한다. 세포와 항체를 내포하는 용액은 얼음 위에서 대략 20분 동안 배양되었다. 세포는 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 작업 완충액으로 세척되고, 세포와 항체를 내포하는 용액은 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되었다. 원심분리후, 상층액은 흡출되고 폐기되며, 펠릿은 대략 80 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다.

<279> CD117 줄기 세포-항체 복합체는 생쥐 IgG의 중쇄(heavy chain) 및/또는 경쇄(light chain)에 결합할 수 있는 염소 항-생쥐 항체로 표지되었다. 자성 마이크로비드는 염소 항-생쥐 항체에 부착된다. 상기 염소 항-생쥐 IgG 항체가 첨가되고, 대략 30분 동안 얼음 위에서 배양되었다. 배양후, 세포는 대략 2 ml의 작업 완충액으로 세척되고 대략 10분 동안 대략 300 g에서 원심분리되었다. 상층액은 흡출되고, 최종 세포는 대략 500 μ l의 작업 완충액에서 현탁되었다.

<280> 작업 완충액을 비롯하여 수확된 줄기 세포와 용액을 포함하는 세포 현탁액은 세포의 비-특이적인 표지화(labeling)를 예방하기 위하여 실험 동안 차게 유지되었다.

<281> MS 칼럼(Miltenyi Biotec)은 칼럼을 통하여 대략 500 μ l의 작업 완충액을 씻어냄으로써 준비되었다. Miltenyi Biotec로부터 구입가능한 Minimacs가 CD117 줄기 세포 선택에 이용되었다. 상기 칼럼은 Miltenyi Biotec로부터 구입가능한 MACS 분리기의 자기장 내에 배치되었다. 피펫을 통하여 세포 현탁액이 상기 칼럼에 첨가되었다. 표지되지 않은 세포와 작업 용액은 칼럼을 통과하고 표현형확인과 세포 계수 분석을 위하여 무균 튜브 내에 수집되었다. 수집된 유출물을 내포하는 튜브는 음성 CD117 세포 분획물로서 표지되었다. 칼럼은 세포 현탁액을 첨가한 이후에, 작업 완충액으로 3회 세척되었다. 칼럼 아래에 무균 튜브가 배치되었는데, 상기 칼럼은 양성 분획물이 칼럼을 통과하여 무균 튜브 내로 들어갈 수 있도록 자기장으로부터 이동되었다. 대략 1 ml의 작업 완충액이 칼럼에 첨가되고, 세포의 양성 분획물이 방출되도록 플런저가 칼럼으로 밀어 넣어졌다. 수집된 유출물을 내포하는 튜브는 양성 CD117 세포 분획물로서 표지되었다.

<282> 양성과 음성 분획물은 생존 세포의 총수를 획득하기 위하여 혈구계로 분석되었다.

<283> 양성 분획물은 Chang 배지에서 배양되었다. 0일에, 4개의 T25 처리되지 않은 배양 플라스크 내에 Chang 배지 내로 대략 900,000 백만개 세포가 대략 cm²당 대략 3,000개 세포로 접종되었다. 플라스크는 대략 37°C 온도에서 대략 5% CO₂에서 배양되었다. 3일에, 세포는 계대 1을 수행하고, 배지가 교체되었다. 추가적인 계대가 3일, 6일과 8일에 진행되었다. 8일에 계대 3에서, 대략 24 백만개 세포가 수확되고, 본 발명의 동결보존 방법에 따라, 대략 20.5 백만개 세포가 동결보존되었다. 남아있는 CD117 양성적으로 선택된 세포는 배양액에 접종되고 여러 번의 추가 계대가 수행되었다. 양성적으로 선택된 세포의 배양액의 계대 5에서, 이들 세포는 표 E에 열거된 바와 같은 세포 표면 마커를 보였다.

표 E

<284> M2-02C/M2-03E 유동 세포 분석

	M2-02C POS FRAC P4	M2-03E POS FRAC P5
	%POS	%POS
HLA-I	99.3	95
CD33	0	0
HLA-II	1.8	35.5
CD9	91.7	28.5
CD54	11.5	0
CD45	6.4	0
CCD10	41.9	2
CD59	100	98.6
CD63	95.2	2

CD34	16.8	86.2
CD13	98.9	98.7
CD49e	92.1	93.8
CD49f	93.4	87
CD81	99	55.6
CD44	100	98.6
CD117	35.3	0
CD38	0	0
CD29	100	98
CD105	100	93.3
CD90	73	98.2
CD166	99.1	99.4
NANOG	0	0
SSEA3	0	0
SSEA4	12.5	0
CD3	0	0
CD19	0	0
CD14	0	0
CD56	1.6	0.2
CD41	98.2	98.2

- <285> 이후, 동결보존된 세포는 해동되고, R. Gonzalez et al., *Pluripotent marker expression and differentiation of human second trimester MSC*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2007)에 기술된 세포 배양, 유동 세포 분석 방법, 핵형분석(karyotype analysis), 분화 방법, 그리고 RNA 추출과 RT-PCR 방법에 따라 분석되었다.
- <286> 동결보존된 세포는 해동되고, Gonzalez의 배양 기술에 따라 1회 계대 배양되었다. 세포는 첫 번째 계대에서 Gonzalez의 유동 세포 분석 방법, 핵형 방법과 분화 방법에 의해 분석되었다. 도 33에서 도시된 바와 같은 유동 세포 분석 결과는 특히 도 34에 도시된 바와 같이, 이들 세포가 CD117과 SSEA-4에 대하여 양성이고, 또한 CD44, CD105, CD166, CD90, CD49f, MHC I, CD29와 CD9에 대하여 양성임을 시사하고, 분리된 세포에서 공동-국지화를 증명하였다. 이들 세포는 또한, CXCR4에 대하여 양성이었다. 이들 세포는 CD38, CD133, CD45, CD34, MHC II와 LIN에 대하여 음성이었다. 도 35a에 도시된 바와 같이, 이들 세포는 배양 동안 대략 24 시간 대략 36 시간의 속도로 배가되었다. 도 35b에 도시된 바와 같이, 최초 세포 배양은 50,000개 세포로 시작되고, 배양 26일째 48,000,000개에 육박하였다. RT-PCR 분석에서, 이들 세포는 도 35b에 도시된 바와 같이, 계대 12에서 다능성 마커(multipotent marker) Oct-4를 발현하지만, SOX-2 또는 Nanog을 발현하지 않는 것으로 밝혀졌다.
- <287> Gonzalez의 방법에 따른 핵형 분석에서, 이들 세포는 외관상으로 정상적인 핵형(normal female karyotype)이고, 염색체 이상(chromosomal aberration)의 부재에서 이배체(diploid) 세포를 유지하는 것으로 밝혀졌다. 이들 세포는 도 39에 도시된 바와 같이 계대 12에서 50% 이상의 텔로메라제 활성(telomerase activity)을 보인다.
- <288> RT-PCR 결과는 도 35b에 도시되고, 이들 세포가 최소한 다능성 마커 Oct-4를 발현한다는 것을 증명한다.
- <289> Gonzalez 방법에 따른 분화 분석의 결과는 이들 세포가 신경 계통(neural lineage), 심장발생 계통(cardiogenic lineage), 연골형성 계통(chondrogenic lineage), 골형성 계통(osteogenic lineage)과 지방형성 계통(adipogenic lineage)으로 분화하는 능력을 가졌음을 증명한다.
- <290> 신경 계통 분화에 대한 Gonzalez 방법의 결과에 따르면, 이들 세포는 도 36에 도시된 바와 같이, 희소돌기아교세포(oligodendroglial cell)에 의해 발현되는 마커 O4와 GalC를 발현함으로써 신경 조직으로 분화하는 능력을 보였다. 신경 유도된 세포는 또한, 도 36에 도시된 바와 같이 뉴런 세포와 신경 전구체에 의해 발현되는 Tub3, Map2와 Vimentin을 발현하였다. FDF를 내포하는 배지에서 4일 동안 배양되고, 대략 7일 동안 FGF, PDGF와 EGF가 첨가되며, 이후 EGF를 제외하고 FGF와 PDGF에서 5일 동안 배양될 때, 이들 세포는 도 36에 도시된 바와 같이 O4와 GalC, 뉴런 마커 Map-2, Vimentin, 그리고 별아교세포(astrocyte) 마커 GFAP를 발현하였다. RT-PCR에서, 이들 세포는 RNA 수준에서, Nestin, NCAM과 Nurr-1을 비롯한 신경 마커를 발현하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 RT-PCR 데이터는 이들 세포가 45-50%의 비율로 복수의 신경 표현형으로 분화하는 잠재력을 갖는다는 것을 증명한다.

- <291> 심장발생 계통 분화에 대한 Gonzalez 방법의 결과에 따르면, 이들 세포는 심장발생 계통으로 분화하는 능력을 보였다. 심장 유도된 세포는 도 37에 도시된 바와 같이, 심장 세포에서 발현되는 액틴(actin)과 트로포닌(troponin)을 발현하였다.
- <292> 연골형성 계통 분화에 대한 Gonzalez 방법의 결과에 따르면, 이들 세포는 도 38c와 38d에 도시된 바와 같이, 연골형성 계통으로 분화하는 능력을 보였다. 연골형성 분화된 세포는 연골형성 조직 유형에 의해 발현되는 황산 프로테오글리칸(sulfated proteoglycan)에 대하여 알시안 블루(alcian blue)로 양성 염색되었다.
- <293> 지방형성 계통 분화에 대한 Gonzalez 방법의 결과에 따르면, 이들 세포는 도 38e와 38f에 도시된 바와 같이, 지방형성 계통으로 분화하는 능력을 보였다. 지방형성 분화된 세포는 특히 FIG. 38f에 도시된 바와 같이, 지방형성 조직에 의해 지방 공포(fat vacuole)에 대하여 오일 레드(oil red) O로 양성 염색되었다.
- <294> 골형성 계통 분화에 대한 Gonzalez 방법의 결과에 따르면, 이들 세포는 도 38a와 38b에 도시된 바와 같이, 골형성 조직의 전형적인 칼슘 침착물(calcium deposit)에 대하여 알리자린 레드 S로 약한 염색을 보였다.
- <295> 심장 계통 분화에 대한 Gonzalez 방법의 결과에 따르면, 이들 세포는 도 37에 도시된 바와 같이, 심장 계통으로 분화하는 능력을 보였다. 이들 세포는 도 37에 도시된 바와 같이, 8 μ M Aza 또는 800 μ M SNAP를 이용한 세포 분화 이후에 심장 마커 액틴, 트로포닌과 코넥신 43에 대하여 양성 염색되었다. RT-PCR 데이터는 이들 세포가 세포 집합체(cell aggregate)로 무성하면, RNA 수준에서 심장 마커를 발현한다는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 이들 세포가 세포와 분자 수준에서 대략 50% 내지 대략 60%의 비율로 심장 마커를 발현한다는 것을 증명한다.
- <296> **연구 실시예**
- <297> 월경 흐름 시료를 수집하는 대안적 방법의 결과를 분석하는 연구가 수행되었다. 본 연구는 항생제와 함께 또는 항생제 없이, 수집 컵과 수집 배지를 이용한 월경 흐름 수집 방법에 따라 수집된 월경 줄기 세포의 전체 유핵 세포수와 세포 생존능을 결정하는데 집중하였다. 본 연구는 또한, 월경 흐름 시료가 얼음 위에서 또는 대안으로, 실온에서 수송되는, 수집후 대략 4 시간 내지 대략 112 시간 사이에 처리 시설에 도달후 월경 흐름 시료의 온도에 집중하였다. 본 연구에 따라, 총 161개의 월경 흐름 시료가 수집되고 분석되었다. 전체 월경 흐름 시료는 아래와 같이 처리되었다: (a) 46개의 월경 흐름 시료가 본 발명에 따라, 수집 장치를 이용하여 수집되고, 항생제를 포함하는 수집 배지 내에 배치되고, 얼음 위에서 수송되었다; (b) 34개의 월경 흐름 시료가 본 발명에 따라, 수집 장치를 이용하여 수집되고, 항생제 없는 수집 배지 내에 배치되고, 실온에서 운송되었다; (c) 81개의 월경 흐름 시료가 본 발명에 따라, 수집 장치를 이용하여 수집되고, 항생제 없는 수집 배지 내에 배치되고, 얼음 위에서 수송되었다.
- <298> 처리 시설에 도달 직후에, 각 시료는 도달 시점에 온도와 전체 월경 흐름 시료 부피를 평가하기 위하여 분석되었다. 혈구계를 이용한 전체 유핵 세포수와 트리판 블루 배제 색소에 의한 세포 생존능은 처리후 평가되었다. 각 시료는 전체 유핵 세포수와 세포 생존능 분석의 평가에 앞서, 1 단계 처리와 선택적 정화 공정과 2 단계 처리가 수행되었다. 모든 시료에서 평가된 평균 세포수(average cell count)는 도 40에 도시된 바와 같이, 대략 7.9 백만개 세포이었다. 생존능 범위는 시료당 대략 6% 내지 대략 100%이었다. 수집된 모든 시료에 대한 평균 세포 생존능은 도 41에 도시된 바와 같이, 트리판 블루 색소 배제에 의한 측정에서 대략 74%이었다. 월경 흐름 시료 도착 시점에 측정된 온도 범위는 본 연구에 의해 분석된 모든 시료에서 대략 5.8℃ 내지 대략 25℃이었다. 월경 흐름 시료 도착 시점에 측정된 평균 온도는 도 42에 도시된 바와 같이 대략 15℃이었다. 수집 배지 내에서 월경 흐름 시료의 전체 부피 범위는 대략 5 ml 내지 대략 30 ml이었다. 수집 배지 내에서 월경 흐름 시료의 평균 부피는 도 43에 도시된 바와 같이, 대략 11 ml이었다.
- <299> 수집 장치를 이용하여 수집되고, 항생제를 포함하는 수집 배지 내에 배치되고, 얼음 위에서 수송된 46개의 월경 흐름 시료 역시 평가되었다. 이들 월경 흐름 시료는 대략 6.6℃ 내지 대략 16.9℃ 범위의 온도로 처리 시설에 도착하였는데, 상기 군에 대한 도착 직후에 평균 온도는 대략 10.5℃이었다. 이들 월경 흐름 시료는 시료 수집 후 대략 4 시간 내지 대략 112 시간 사이에 처리 시설에 도착하였는데, 상기 군에 대한 평균 시간은 대략 47.9 시간이었다. 수집 배지 내에서 월경 흐름을 포함하는 월경 흐름 시료 부피 범위는 대략 5 ml 내지 대략 30 ml이고, 상기 군에 대한 평균은 11.5 ml이었다. 상기 군에 대한 세포 생존능은 처리후 시료에서 평가되었는데, 이의 범위는 대략 6% 내지 대략 100% 생존능이고, 평균적으로 대략 72% 생존능이었다. 단지 3개의 시료만 50% 미만의 생존능을 갖는 것으로 평가되었다. 상기 군에 대한 전체 유핵 세포수는 처리후 시료에서 평가되었는데, 이의 범위는 대략 0.2 백만개 세포 내지 대략 9.24 백만개 세포이고, 평균적으로 대략 9.24 백만개 세포이었다. 이들

처리후 월경 세포는 본 발명의 동결보존 방법에 따라 동결보존되고, 이후 세포 생존능과 전체 유핵 세포수의 추가적인 평가에 대비하여 해동되었다. 배양된 이들 해동된 시료에서, 트리판 블루에 의해 평가된 세포 생존능은 대략 60% 내지 대략 100%의 범위에서 생존능을 지시하였다. 이들 해동된 시료에서, 전체 유핵 세포수의 범위는 대략 0.1 백만개 세포 내지 대략 13.0 백만개 세포이고, 평균적으로 대략 3.24 백만개 세포이었다.

<300> 수집 장치를 이용하여 수집되고, 항생제 없는 수집 배지 내에 배치되고, 실온에서 수송된 34개의 월경 흐름 시료 역시 평가되었다. 이들 월경 흐름 시료는 대략 21℃ 내지 대략 25℃ 범위의 온도로 처리 시설에 도착하였는데, 상기 군에 대한 도착 직후에 평균 온도는 대략 22.8℃이었다. 이들 월경 흐름 시료는 시료 수집후 대략 7 시간 내지 대략 94 시간 사이에 처리 시설에 도착하였는데, 상기 군에 대한 평균 시간은 대략 37 시간이었다. 수집 배지 내에서 월경 흐름을 포함하는 월경 흐름 시료 부피 범위는 대략 7.4 ml 내지 대략 17.5 ml이고, 상기 군에 대한 평균은 10.8 ml이었다. 상기 군에 대한 세포 생존능은 처리후 시료에서 평가되었는데, 이의 범위는 대략 12% 내지 대략 100% 생존능이고, 평균적으로 대략 80% 생존능이었다. 상기 군에 대한 전체 유핵 세포수는 처리후 시료에서 평가되었는데, 이의 범위는 대략 0.3 백만개 세포 내지 대략 50.0 백만개 세포이고, 평균적으로 대략 11.6 백만개 세포이었다. 이들 처리후 월경 세포는 본 발명의 동결보존 방법에 따라 동결보존되고, 이후 세포 생존능과 전체 유핵 세포수의 추가적인 평가에 대비하여 해동되었다. 이들 해동된 시료에서, 트리판 블루에 의해 평가된 세포 생존능은 대략 37% 내지 대략 100%의 범위에서 생존능을 지시하였다. 이들 해동된 시료에서, 전체 유핵 세포수 범위는 대략 0.1 백만개 세포 내지 대략 5.9 백만개 세포이고, 평균적으로 대략 1.62 백만개 세포이었다.

<301> 수집 장치를 이용하여 수집되고, 항생제 없는 수집 배지 내에 배치되고, 얼음 위에서 수송된 81개의 월경 흐름 시료 역시 평가되었다. 이들 월경 흐름 시료는 대략 5.8℃ 내지 대략 25.8℃ 범위의 온도로 처리 시설에 도착하였는데, 상기 군에 대한 도착 직후에 평균 온도는 대략 15.5℃이었다. 이들 월경 흐름 시료는 시료 수집후 대략 2.5 시간 내지 대략 164 시간 사이에 처리 시설에 도착하였는데, 상기 군에 대한 평균 시간은 대략 54.6 시간이었다. 수집 배지 내에서 월경 흐름을 포함하는 월경 흐름 시료 부피 범위는 대략 5.1 ml 내지 대략 21.5 ml이고, 상기 군에 대한 평균은 10.8 ml이었다. 상기 군에 대한 세포 생존능은 처리후 시료에서 평가되었는데, 이의 범위는 대략 10% 내지 대략 100% 생존능이고, 평균적으로 대략 73% 생존능이었다. 상기 군에 대한 전체 유핵 세포수는 처리후 시료에서 평가되었는데, 이의 범위는 대략 0.1 백만개 세포 내지 대략 42.0 백만개 세포이고, 평균적으로 대략 5.84 백만개 세포이었다. 이들 처리후 월경 세포는 본 발명의 동결보존 방법에 따라 동결보존되고, 이후 세포 생존능과 전체 유핵 세포수의 추가적인 평가에 대비하여 해동되었다. 이들 해동된 시료에서, 트리판 블루에 의해 평가된 세포 생존능은 대략 45% 내지 대략 100%의 범위에서 생존능을 지시하였다. 이들 해동된 시료에서, 전체 유핵 세포수 범위는 대략 0.1 백만개 세포 내지 대략 48.3 백만개 세포이고, 평균적으로 대략 8.45 백만개 세포이었다.

<302> 월경 줄기 세포 클론

<303> 월경 흐름 시료는 본 발명의 수집 방법에 따라 4명의 상이한 공여자로부터 수집되고, MSC 클론은 월경 흐름 시료로부터 발생되었다.

<304> 월경 줄기 세포 클론 - M2-014-02

<305> 여러 상이한 월경 줄기 세포 클론이 본 발명의 실시예에 따라 획득되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-014-02로 명명된 대략 30 ml의 월경 흐름 시료가 수집되었다. 상기 월경 흐름 시료는 월경 흐름을 포함하고, 수집 배지는 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 비누와 물로 청소되고, 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드가 없는 DPBS(Mediatech), 대략 100 unit/ml에서 페니실린, 대략 100 µg/ml에서 스트렙토마이신, 그리고 DPBS 배지 ml 당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 헤파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 수집 용기 내에 얼음 위에서 포장되고, 운송에 의해 처리 시설로 수송되었다.

<306> 수집으로부터 대략 17 시간후, 수집 배지 내에서 대략 30 ml의 월경 흐름 시료는 월경 줄기 세포를 분리하고 수집하는 처리가 수행되었다. 월경 흐름 시료는 대략 10℃로 처리 시설에 도착하였다. 월경 흐름 시료와 항생제를 내포하는 수집 배지는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18℃ 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 호기성과 혐기성 미생물에 대한

여 음성이었다.

- <307> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠릿은 대략 2 ml의 DPBS에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 위하여 분석되었다. 혈구계를 이용하여 수행된 전체 세포 계수(total cell count)는 처리후 시료에서 대략 41 백만개 세포가 수집됨을 지시하였다. 수집된 세포는 동결보존에 앞서 대략 75% 생존능을 보였다.
- <308> 동결보존된 월경 줄기 세포는 해동되고, 트립신화되고, 배양되었다. 배양에 앞서, 해동후 월경 줄기 세포가 분석되었다. 해동후 시료에서 전체 세포 계수는 대략 7 백만개 월경 세포가 대략 66% 생존능으로 존재함을 지시하였다.
- <309> 배양에 앞서, 세포는 20% Chang 배지로 처리된 2 단계 희석액에서, 대략 2.5개 세포/ml, 대략 5.0개 세포/ml, 대략 10.0개 세포/ml, 그리고 대략 15.0개 세포/ml로 희석된다. 대략 0.2 ml의 각 희석액이 96 웰 평판 내에서 84개 웰에 개별적으로 첨가되고, 나머지 12개 웰은 평판을 축축하게 하기 위하여 DPBS로 채워진다. 대략 2.5개 세포/ml 희석은 0.5개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 5.0개 세포/ml 희석은 1.0개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 10.0개 세포/ml 희석은 2개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 15.0개 세포/ml 희석은 3개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 이들 웰은 도립 현미경(inverted microscope) 하에서 단일 세포에 대하여 조사된다. 배지는 4일 내지 6일마다 새로운 20% Chang 배지로 교체된다. 단일 세포를 내포하는 웰은 50% 합류(confluency)까지 성장하게 되는데, 이 시점에서 세포는 트립신화되고, 세포는 20% Chang 배지를 내포하는 T-25 플라스크에 집중된다. 특징의 세포는 본 발명의 방법에 따른 세포 배양을 위하여 웰로부터 이전된다.
- <310> 세포 배양에 앞서, 평판으로부터 6개의 월경 줄기 세포 클론이 수집되고, 각 클론은 세포 표면 특징에 대한 본 명세서에 개시된 방법에 따른 유동 세포 분석으로 분석된다. 각 클론의 세포 표면 특징의 요약은 표 F에 제시된다.

표 F

월경 줄기 세포 클론

	M2-014-02 F9 P4	M2-014-02 2.0CW C2 P5	M2-014-02 1.0 G6 P4	M2-014-02 0.5 F9 P6	M2-014-02 3.0 B11 P4	M2-014-02 1.0 E2 P5
	%POS	%POS	%POS	%POS	%POS	%POS
HLA-I	100	99	99	84.4	98.2	95.2
CD133	0	0	0	0	0	0
HLA-II	0	20	0	3.9	3.2	5.1
CD9	50	97	51	79	39.9	69.6
CD54	20	20	0	14.3	1.3	22.4
CD45	10	10	0	30.2	0.8	19.4
CCD10	40	15	50	44.4	95.7	40.9
CD59	98	100	99	80	98.9	97.4
CD63	5	5	2	0	38.1	0
CD34	12	12	14	23	10.3	808
CD13	98	96	99	92.8	98.7	98.7
CD49e	94	93	95	71.1	51.7	55.6
CD49f	95	86	95	84.7	96.8	87.9
CD81	99	95	98	86.2	96.2	88.3
CD44	100	100	99	79.9	99.1	97.3
CD117	0	0	0	0	1.1	2.1
CD38	0	0	0	0	0	0
CD29	100	99	100	79.9	98.9	97.8
CD105	100	96	99	87.4	95.1	95.6
CD90	17	80	1	0.4	0.6	15.3
CD166	100	96	100	88.5	99.4	97.6
NANOG	0	ND	ND	0	0.2	0
SSEA3	0	ND	ND	0	0	0
SSEA4	8	ND	ND	2	22.8	0
CD3	0	0	0	0	0	0
CD19	0	0	0	0	0	0
CD14	5	10	2	0		
CD56	87	30	94	43.5	13.2	88.8
CD41	98	92	98	90.1	81.8	90.8

월경 줄기 세포 클론 - M2-015-03

여러 상이한 월경 줄기 세포 클론이 본 발명의 실시예에 따라 획득되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-015-03으로 명명된 대략 30 ml의 월경 흐름 시료가 수집되었다. 상기 월경 흐름 시료는 월경 흐름을 포함하고, 수집 배지는 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 비누와 물로 청소되고, 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드와 없는 DPBS(Mediatech), 대략 100 unit/ml에서 페니실린, 대략 100 µg/ml에서 스트렙토마이신, 그리고 DPBS 배지 ml 당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 헤파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 수집 용기 내에 얼음 위에서 포장되고, 운송에 의해 처리 시설로 수송되었다.

수집으로부터 대략 6 시간후, 수집 배지 내에서 대략 23 ml의 월경 흐름 시료는 월경 줄기 세포를 분리하고 수집하는 처리가 수행되었다. 월경 흐름 시료는 대략 10°C로 처리 시설에 도착하였다. 월경 흐름 시료와 항생제를 내포하는 수집 배지는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18°C 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37°C에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 호기성과 혐기성 미생물에 대하여 음성이었다.

- <315> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠릿은 대략 2 ml의 DPBS에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 위하여 분석되었다. 혈구계를 이용하여 수행된 전체 세포 계수(total cell count)는 처리후 시료에서 대략 1 백만개 세포가 수집됨을 지시하였다. 수집된 세포는 동결보존에 앞서 대략 18% 생존능을 보였다.
- <316> 동결보존된 월경 줄기 세포는 해동되고, 트립신화되고, 배양되었다. 배양에 앞서, 해동후 월경 줄기 세포가 분석되었다. 해동후 시료에서 전체 세포 계수는 대략 0.3 백만개 월경 세포가 대략 60% 생존능으로 존재함을 지시하였다.
- <317> 배양에 앞서, 세포는 20% Chang 배지로 처리된 2 단계 희석액에서, 대략 2.5개 세포/ml, 대략 5.0개 세포/ml, 대략 10.0개 세포/ml, 그리고 대략 15.0개 세포/ml로 희석된다. 대략 0.2 ml의 각 희석액이 96 웰 평판 내에서 84개 웰에 개별적으로 첨가되고, 나머지 12개 웰은 평판을 축축하게 하기 위하여 DPBS로 채워진다. 대략 2.5개 세포/ml 희석은 0.5개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 5.0개 세포/ml 희석은 1.0개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 10.0개 세포/ml 희석은 2개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 15.0개 세포/ml 희석은 3개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 이들 웰은 도립 현미경(inverted microscope) 하에서 단일 세포에 대하여 조사된다. 배지는 4일 내지 6일마다 새로운 20% Chang 배지로 교체된다. 단일 세포를 내포하는 웰은 50% 합류(confluency)까지 성장하게 되는데, 이 시점에서 세포는 트립신화되고, 세포는 20% Chang 배지를 내포하는 T-25 플라스크에 집중된다. 특징의 세포는 본 발명의 방법에 따른 세포 배양을 위하여 웰로부터 이전된다.
- <318> 계대 2에서, 평판으로부터 2개의 월경 줄기 세포 클론이 수집되고 배양된다. 각 클론은 세포 표면 특징에 대한 본 명세서에 개시된 방법에 따른 유동 세포 분석으로 분석된다. 각 클론의 세포 표면 특징의 요약은 표 G에 제시된다.

표 G

- <319> 월경 줄기 세포 클론

	M2-015-03 ABi P2 B10 P6	M2-015-03 ABi P2 2.0 B2
	%POS	%POS
HLA-I	95.2	100
CD133	0	0
HLA-II	46.8	0
CD9	56.4	70
CD54	47.8	2
CD45	22.4	2
CCD10	10.6	20
CD59	97.4	100
CD63	0	1
CD34	68.1	0
CD13	96.4	100
CD49e	58.7	90
CD49f	46.6	98
CD81	94.7	99
CD44	97.4	100
CD117	0	0
CD38	0	0
CD29	97.1	100
CD105	96.7	100
CD90	1	10
CD166	97.9	100
NANOG	0	0
SSEA3	0	0
SSEA4	9.8	35
CD3	0	0

CD19	0	0
CD14	0	0
CD56	5.7	90
CD41	95.2	98

<320> 월경 줄기 세포 클론 - M2-017-03

<321> 여러 상이한 월경 줄기 세포 클론이 본 발명의 실시예에 따라 획득되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-017-03으로 명명된 대략 30 ml의 월경 흐름 시료가 수집되었다. 상기 월경 흐름 시료는 월경 흐름을 포함하고, 수집 배지는 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 비누와 물로 청소되고, 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드가 없는 DPBS(Mediatech)와 DPBS 배지 ml당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 헤파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 운송에 의해 처리 시설로 얼음 없이 수송되었다.

<322> 수집으로부터 대략 28 시간후, 수집 배지 내에서 대략 8 ml의 월경 흐름 시료는 월경 줄기 세포를 분리하고 수집하는 처리가 수행되었다. 월경 흐름 시료는 대략 23℃로 처리 시설에 도착하였다. 월경 흐름 시료와 항생제를 내포하는 수집 배지는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18℃ 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 장구균(*E. faecalis*)에 의한 오염을 지시한다.

<323> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠렛은 대략 2 ml의 DPBS에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 위하여 분석되었다. 혈구계를 이용하여 수행된 전체 세포 계수(total cell count)는 처리후 시료에서 대략 0.8 백만개 세포가 수집됨을 지시하였다. 수집된 세포는 동결보존에 앞서 대략 87% 생존능을 보였다.

<324> 동결보존된 월경 줄기 세포는 해동되고, 트립신화되고, 배양되었다. 배양에 앞서, 해동후 월경 줄기 세포가 분석되었다. 해동후 시료에서 전체 세포 계수는 대략 0.2 백만개 월경 세포가 대략 63% 생존능으로 존재함을 지시하였다.

<325> 배양에 앞서, 세포는 20% Chang 배지로 처리된 2 단계 희석액에서, 대략 2.5개 세포/ml, 대략 5.0개 세포/ml, 대략 10.0개 세포/ml, 그리고 대략 15.0개 세포/ml로 희석된다. 대략 0.2 ml의 각 희석액이 96 웰 평판 내에서 84개 웰에 개별적으로 첨가되고, 나머지 12개 웰은 평판을 축축하게 하기 위하여 DPBS로 채워진다. 대략 2.5개 세포/ml 희석은 0.5개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 5.0개 세포/ml 희석은 1.0개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 10.0개 세포/ml 희석은 2개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 15.0개 세포/ml 희석은 3개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 이들 웰은 도립 현미경(inverted microscope) 하에서 단일 세포에 대하여 조사된다. 배지는 4일 내지 6일마다 새로운 20% Chang 배지로 교체된다. 단일 세포를 내포하는 웰은 50% 합류(confluency)까지 성장하게 되는데, 이 시점에서 세포는 트립신화되고, 세포는 20% Chang 배지를 내포하는 T-25 플라스크에 접종된다. 특정의 세포는 본 발명의 방법에 따른 세포 배양을 위하여 웰로부터 이전된다.

<326> 첫 번째 계대까지 배양 동안, 암포테리신 B가 Penn/Strep와 함께 배양 배지에 포함되었다. 계대 3에서, 배양 중인 각 클론은 세포 표면 특징에 대한 본 명세서에 개시된 방법에 따른 유동 세포 분석으로 분석된다. 각 클론의 세포 표면 특징의 요약은 표 H에 제시된다.

표 H

<327> 월경 줄기 세포 클론

	M2-017-03-G2 P3	M2-017-03 0.5 B2	M2-017-03 P3 0.5 E1 P4	M2-017 03 P3 0.5 B2 P5
	%POS	%POS	%POS	%POS
HLA-I	99	93.8	99	99.1
CD133	0	0	0	0

HLA-II	24	0.2	1.1	1
CD9	98	73.3	61.7	64
CD54	2	27.6	8.8	9.3
CD45	16	8.2	5.9	1
CCD10	98	11.3	10.7	9
CD59	100	94.7	99.3	99.5
CD63	0	1.5	0	1.4
CD34	44	3	1.9	15.4
CD13	100	99.1	99	99.2
CD49e	100	89.8	47.6	68.7
CD49f	100	94.5	97.8	98.8
CD81	100	97.2	96	99.2
CD44	99	94.1	99.4	99.6
CD117	0	0	0	0
CD38	0	0	0	0
CD29	100	94.6	99.2	99.5
CD105	97	98.3	99	99.4
CD90	99	95	98.9	91.1
CD166	99	99.3	99.3	99.6
NANOG	ND	0	0	0.3
SSEA3	0	0	0	0
SSEA4	20	38.6	10.4	42.4
CD3	0	0	0	0
CD19	0	0	0	0
CD14	20	0	0	
CD56	0	0	0	0
CD41	99	97.1	98.4	97.3

<328> 월경 줄기 세포 클론 - M2-54-02

<329> 여러 상이한 월경 줄기 세포 클론이 본 발명의 실시예에 따라 획득되었다. 특히, 본 명세서에서 M2-54-02로 명명된 대략 12 ml의 월경 흐름 시료가 수집되었다. 상기 월경 흐름 시료는 월경 흐름을 포함하고, 수집 배지는 월경 주기 동안 공여자에 의해 수집되었다. 멸균된 수집 장치는 비누와 물로 청소되고, 월경 흐름의 시료를 수집하는데 충분한 기간 동안 공여자의 질 내에 배치되었다. 수집 배지는 칼슘, 마그네슘 또는 페놀 레드와 없는 DPBS(Mediatech)와 DPBS 배지 ml당 대략 10 unit 내지 대략 20 unit 범위에서 보존제-없는 해파린을 포함하였다. 월경 흐름 시료와 수집 배지는 수집 튜브에 봉인되고, 수집 용기 내에 얼음 위에서 포장되고, 운송에 의해 처리 시설로 수송되었다.

<330> 수집으로부터 대략 73 시간후, 수집 배지 내에서 대략 12 ml의 월경 흐름 시료는 월경 줄기 세포를 분리하고 수집하는 처리가 수행되었다. 월경 흐름 시료는 대략 20℃로 처리 시설에 도착하였다. 월경 흐름 시료와 항생제를 대포하는 수집 배지는 처리 시설에 도달 직후에 살균되고, 무균실로 이전되고, 얼음 위에 배치되었다. 수집 용기는 대략 18℃ 온도에서 대략 7분 동안 대략 2000 rpm으로 원심분리되고, 이후 살균되었다. 상층액의 대략 5 ml 시료가 흡출되고 2개의 BacT/ALERT 혈액 배양 병(호기성 배양 병(aerobic culture bottle) 내로 대략 4 ml와 혐기성 배양 병(anaerobic culture bottle) 내로 대략 1 ml)을 접종하는데 이용되었다. 이들 배양 병은 대략 37℃에서 대략 14일 동안 BacT/ALERT 시스템에서 배양되었다. 이로부터 결과는 표피성 포도상구균(*S. epidermidis*)에 의한 오염을 지시하였다.

<331> 남아있는 상층액은 흡출되고 폐기되었다. 펠렛은 대략 2 ml의 DPBS에서 현탁되었다. 대략 1 ml의 세포 현탁액은 처리후 시료로서 수집되고 세포 계수, 유동 분석과 생존능 검사를 위하여 분석되었다. 혈구계를 이용하여 수행된 전체 세포 계수(total cell count)는 처리후 시료에서 대략 0.8 백만개 세포가 수집됨을 지시하였다. 수집된 세포는 동결보존에 앞서 대략 72% 생존능을 보였다.

<332> 동결보존된 월경 줄기 세포는 해동되고, 트립신화되고, 배양되었다. 배양에 앞서, 해동후 월경 줄기 세포가 분석되었다. 해동후 시료에서 전체 세포 계수는 대략 21 백만개 월경 세포가 대략 92% 생존능으로 존재함을 지시

하였다.

<333> 배양에 앞서, 세포는 20% Chang 배지로 처리된 2 단계 희석액에서, 대략 2.5개 세포/ml, 대략 5.0개 세포/ml, 대략 10.0개 세포/ml, 그리고 대략 15.0개 세포/ml로 희석된다. 대략 0.2 ml의 각 희석액이 96 웰 평판 내에서 84개 웰에 개별적으로 첨가되고, 나머지 12개 웰은 평판을 축축하게 하기 위하여 DPBS로 채워진다. 대략 2.5개 세포/ml 희석은 0.5개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 5.0개 세포/ml 희석은 1.0개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 10.0개 세포/ml 희석은 2개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 대략 15.0개 세포/ml 희석은 3개 세포/웰을 갖는 평판을 산출한다. 이들 웰은 도립 현미경(inverted microscope) 하에서 단일 세포에 대하여 조사된다. 배지는 4일 내지 6일마다 새로운 20% Chang 배지로 교체된다. 단일 세포를 내포하는 웰은 50% 합류(confluency)까지 성장하게 되는데, 이 시점에서 세포는 트립신화되고, 세포는 20% Chang 배지를 내포하는 T-25 플라스크에 접종된다. 특정의 세포는 본 발명의 방법에 따른 세포 배양을 위하여 웰로부터 이전된다.

<334> 배양에 앞서, 배양액으로부터 1개의 월경 줄기 세포 클론이 수집되고, 세포 표면 특징에 대한 본 명세서에 개시된 방법에 따른 유동 세포 분석으로 분석된다. 상기 클론의 세포 표면 특징의 요약은 표 I에 제시된다.

표 I

<335> 월경 줄기 세포 클론

	M2-054-02-H9 P5
	%POS
HLA-I	99
CD133	0
HLA-II	8
CD9	98
CD54	10
CD45	45
CCD10	80
CD59	99
CD63	0
CD34	41
CD13	99
CD49e	95
CD49f	91
CD81	98
CD44	99
CD117	0
CD38	0
CD29	99
CD105	70
CD90	7
CD166	99
NANOG	ND
SSEA3	0
SSEA4	2
CD3	0
CD19	20
CD14	40
CD56	96
CD41	94

<336> 치료 용도

<337> 본 발명의 월경 줄기 세포는 세포를 적절한 세포 배지 또는 제약용으로 허용되는 부형제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 가령, 본 발명의 월경 줄기 세포는 우수 제조 관리기준(Good Manufacturing Practice, GMP)에 따라,

주입(infusion) 또는 이식(transplant) 용도로 제조될 수 있다. 적절한 배지 또는 희석제에는 조직 배양 배지(적절한 검사와 결과가 분석증명서에 상세하게 기록되어 있음), 예를 들면, HBSS, IMDM, RPMI, 알파 MEM, M199와 DMEM이 포함되는데, 이들은 월경 줄기 세포를 부양하기 위하여 적절한 pH를 유지하는 HEPES 완충액을 필요로 한다. 단백질은 대략 0.2%의 최소한으로 첨가될 수 있지만, 많게는 대략 30%까지 첨가될 수도 있다. 이용된 단백질에는 또한, 인간 혈청 알부민, 인간 혈장 단백질 분획물, 우 태아 혈청(동물 부산물(animal product)이 이용되면, 이들은 United States Food and Drug Administration에 의해 요구되는 적절한 안정성 검사(safety testing)를 받아야 한다), 또는 소 혈청 알부민이 포함될 수 있다. 배지는 세포에서 응고(coagulation), 응괴(clumping), 또는 덩어리(clot)가 발생할 위험이 있으면, 항응고물질을 필요로 할 수도 있다. 항응고물질에는 헤파린(보존제가 세포의 줄기 세포 성장과 증식 능력에 잠재적으로 영향을 줄 수 있기 때문에, 보존제 없음이 바람직하다), 산 구연산염 텍스트로스(acid citrate dextrose), 구연산염 인산염 텍스트로스(citrate phosphate dextrose), 또는 생존 세포와 혼합하기 안전한 임의의 적절한 항응고물질이 포함된다. 세포는 주입 또는 이식용으로 안전하고 그들이 확대되는 세포 배지 내에 담겨 운송될 수 있다.

<338> 세포는 짧은 거리의 경우에, 예를 들면, 산물이 병원 내에서 만들어지고 병원 내에서 투여되는 경우에, 주사기에 담겨 운송될 수 있다. 대안으로, 산물은 공기 교환능(gas exchange)을 보유하거나 보유하지 않는 무균 가방에 담겨 수송될 수 있다. 단거리 운송된 산물은 또한, 세포가 짧은 거리 동안 견디고 생존을 유지하는 임의의 다른 유형의 무균 용기, 예를 들면, 무균 삼각 튜브, 또는 무균 평바닥 용기(원형 또는 사각형)에 담겨 수송될 수도 있다. 산물은 4 시간 이상 동안 장거리 운송되면, 공기 교환을 가능하게 하는 가방에 담겨 발송될 수 있다. 이러한 가방은 또한, 공기 교환을 가능하게 하는 형태로 운송될 수도 있다. 산물 가방은 이러한 가방이 담겨 운송되는 용기 내에서 적절한 공기 교환을 가능하게 하는 선반 위에 배치될 수 있다. 세포를 포함하는 용기는 월경 줄기 세포를 유지하는 적절한 온도에 최적화될 수 있다. 세포가 서늘한 환경을 필요로 하면, 아이스 팩(ice pack) 또는 다른 냉각 장치가 이용될 수 있다. 세포가 대략 20℃ 내지 대략 24℃에서 실온을 필요로 하면, 상기 온도를 유지하기 위하여 겔 팩(gel pack)이 요구될 수 있다.

<339> 세포가 주입 또는 이식을 위하여 시설에 도착하면, 이들 세포는 감시된 온도 환경 내에 배치될 수 있다. 후기 일자에 이용을 위하여 저장되는 세포는 -150℃ 이하의 온도를 유지하는 질소 운송장치(dry shipper) 내에서 동결보존 상태로 운송될 수 있다. 동결보존 상태로 운송되는 세포는 해동과 주입 설명서, 그리고 잠재적으로, 치료 용도를 위한 최적 생존 세포 산물을 유지하는데 필요한 배지와 함께 발송될 수 있다.

<340> 산물을 주입 위치로 수송하기 위하여 적절한 수송 메커니즘이 이용되어야 한다. 다수의 상이한 유형의 수송 서비스, 예를 들면, 의료 택배 서비스(medical courier service), 택배 서비스(courier service), 또는 UPS, DHL 또는 FedEx와 같은 회사가 이용될 수 있다. 배지 내에 월경 줄기 세포는 예로써, 산물의 질소 운송장치가 이동 동안 직립 상태로 유지되어야 한다는 사실을 택배업체가 인지한다면, 안전한 수송의 기회가 더욱 높을 것이다. 질소 운송장치가 옆으로 눕혀지게 배치되면, 이는 액화 질소(liquid nitrogen)의 충전을 급격하게 상실하고, 유효함이 확인되었던 온도를 유지하지 못하게 된다.

<341> **약용 화장 적용**

<342> 약용 화장(cosmeceutical)이란 용어는 (a) 산물 이용자에게 영향을 주는 최소한 하나의 생물학적 활성 성분과 (b) 최소한 하나의 화장용으로 허용되는 담체를 함유하는 제제 또는 조성물에 관련하여 이용된다. 생물학적 활성 성분은 예로써, 본 발명의 실시예에 따라 수집된 MSC, 또는 본 발명의 MSC, 유전자 조작된 MSC, 또는 분화된 MSC에 의해 생산된 성장 인자 또는 다른 조성물, 화학물질, 또는 단백질이다. 추가의 실례로써, MSC, 분화된 MSC, 또는 유전자-조작된 MSC는 원하는 세포 산물, 예를 들면, 약용 화장품으로서 이용될 수 있는 성장 인자 또는 다른 생물학적 활성 성분을 생산하기 위하여 배양 성장될 수 있다. 성장 인자 또는 다른 생물학적 활성 성분은 MSC, 분화된 MSC, 또는 유전자-조작된 MSC가 성장되는 세포 배양 배지 또는 다른 배지로부터 수집될 수 있다. 성장 인자 또는 다른 생물학적 활성 성분은 상층액 내에서 원하는 성분을 수집하는 원심분리 단계에 의해 세포 배양 배지 또는 다른 배지로부터 수집되고, 이후 이러한 성분을 정제 또는 농축하기 위하여 처리될 수 있다.

<343> 약용 화장품은 특정의 적용에서 적절한 조건 하에, 의학적이거나 또는 약물-유사 혜택을 제공하는 화장품(cosmetics)으로 간주될 수 있다. 특정의 적용에서, 예로써, 약용 화장품은 피부의 기초 구조(underlying structure)에 영향을 주거나, 주름 깊이(wrinkle depth)를 감소시키거나, 또는 피부에 대한 광산화(photooxidation) 또는 노화(aging)의 효과를 반전시키거나 완화시킬 수 있다. 약용 화장품은 특히, 피부 관리 산물(skin care product), 헤어 관리 산물(hair care product), 조직 또는 장기 개량 또는 확대, 그리고 일광 관리 산물(sun care

product)로서 유용할 수 있다. 특정의 구체예에서, 약용 화장 조성물은 리포솜(liposome), 사이클로덱스트린(cyclodextrin), 고분자(polymer) 시스템, 또는 히알루론산(hyaluronic acid) 또는 관련된 화합물 중에서 최소한 한 가지를 비롯한 전달 시스템(delivery system)을 함유한다. 약용 화장 조성물은 화장용으로 허용되는 담체를 함유한다. 국소 적용(topical application)에 적합한 제약용으로 허용되는 담체 또는 제제는 전형적으로, 화장용으로 허용되는 담체 또는 제제일 것이다.

<344> 국소 화장 또는 약용 화장 연고(ointment), 로션(lotion), 또는 겔 조성물은 전형적으로, 화장용으로 허용되는 담체 또는 약용 화장용으로 허용되는 담체, 예를 들면, 제약학적 크림 기부(pharmaceutical cream base), 수중 유 에멀전(oil-in-water emulsion), 유중수 에멀전(water-in-oil emulsion), 겔 등에서 대략 1% 내지 99%, 대략 5% 내지 95%, 대략 20% 내지 75%, 또는 대략 5% 내지 20%로, 조건 배지(conditioned media) 또는 이의 추출물을 포함하는 활성 성분의 농축물을 내포한다. 국소 이용을 위한 다양한 화장과 약용 화장 조성물에는 조건 배지 또는 추출물과 적절한 담체를 내포하는 점적약(drop), 톱크제(tincture), 로션(lotion), 크림(cream), 고약(salve), 혈청(serum), 용액(solution), 그리고 연고(ointment)가 포함된다. 각 조성물 내에서 이러한 조건 배지 또는 추출물의 최적 비율은 조성물의 제제와 원하는 치료 효과에 따라 달라진다.

<345> 약용 화장품은 산물의 유형, 조성물의 성질, 조성물의 이용 부위, 원하는 효과 등에 따라, 다수의 화장용으로, 약용 화장용으로, 또는 제약용으로 허용되는 제제를 함유할 수 있다. 독점적 제제가 제제 분야에서 일반적이긴 하지만, 이들 제제의 제조업체는 과도한 실험 없이 특정 적용에 적합한 제제를 결정하거나 용이하게 선택할 수 있을 것이다.

<346> 본 발명의 조성물의 적절한 담체는 전형적으로, 화장 분야와 약용 화장 분야에서 전형적으로 발견되는 것들과 같은 성분: 오일(oil), 왁스(wax) 또는 다른 표준 지방 물질(standard fatty substance), 또는 전통적인 겔화제(gelling agent) 및/또는 농후제(thickener); 유화제(emulsifier); 보습제(moisturizing agent); 연화제(emollient); 일광차단제(sunscreen); 친수성(hydrophilic) 또는 친지성(lipophilic) 활성제, 예를 들면, 세라마이드(ceramide); 유리 라디칼(free radical)을 억제하는 작용제; 살균제(bactericide); 격리제(sequestering agent); 보존제(preservative); 염기화제(basifying agent) 또는 산성화제(acidifying agent); 방향(fragrance); 계면활성제(surfactant); 충전제(filler); 천연 산물(natural product) 또는 천연 산물의 추출물, 예를 들면, 알로에(aloe) 또는 녹차(green tea) 추출물; 비타민(vitamin); 또는 착색 물질(coloring material)을 내포할 것이다. 이들 다양한 성분의 양은 조성물의 용도와 원하는 화장 또는 약용 화장 효과에 따라 달라질 것이다.

<347> 화장과 약용 화장용으로 허용되는 성분과 제제에 관한 논의는 특히, FDA Cosmetics Handbook, U.S. Food and Drug Administration; Handbook of Cosmetic and Personal Care Additives, Ash and Ash, compilers, 1994, Chemical Publishing, New York, N. Y.; Bennett's Cosmetic Formulary, 1993, Chemical Publishing Co.; Harry's Cosmetology, 7.sup.th ed., Wilkinson & Moore, 1982 and 8.sup.th ed., Rieger, 2000, Chemical Publishing; Cosmetic Bench Reference-2001, Allerud Publishing Corp.; CTFA Compendium of Cosmetic Ingredient Composition, Nikitakis and McEwen, eds., 1990, Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Washington, D.C., Surfactant Encyclopedia, 2.sup.nd revised edition, Rieger, 1996, Allured Publishing; The Chemistry and Manufacture of Cosmetics, 2.sup.nd ed., De Navarre, Van Nostrand, Princeton, N.J.; Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics, Leung, 1996, John Wiley; A Consumer's Dictionary of Cosmetic Ingredients, 5.sup.th ed., Winter, 1999, Three Rivers Press, New York, N.Y.; Cosmetics: Active Skin Treatment, 1998, Allured Publishing; Handbook of Cosmetic Science and Technology, Knowlton and Pearce, 1993, Elsevier Advanced Technology, Oxford, UK; Personal-Care Formulas, 1997, Allured Publishing; Beginning Cosmetic Chemistry, Scheuller and Romanowski, 1999, Allured Publishing; Skin Permeation: Fundamentals and Application, Zatz, 1993, Allured Publishing에서 확인할 수 있다. 제약에서 허용되는 성분과 제제에 관한 논의는 특히, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.sup.th ed., Gennaro, ed., 1990, Mack Publishing에서 확인할 수 있다.

<348> 정의

<349> 본 명세서에서, 아래의 용어는 본문에서 달리 명시되지 않는 경우에, 아래에 열거된 정의를 갖는다.

<350> DMEM은 Dulbecco 최소 필수 배지를 의미한다.

- <351> DMSO는 디메틸 설펡시드(dimethyl sulfoxide)를 의미한다.
- <352> DNase는 비-생존 세포가 용해된 이후에 관찰되는 DNA를 파괴하는데 이용되는 디옥시리보핵산(deoxyribonuclease)을 의미한다.
- <353> DPBS는 Dulbecco 인산염 완충된 염수를 의미한다.
- <354> HBSS는 Hank 균형된 염 용액을 의미한다.
- <355> 헤파린은 항응고 성질(anticoagulant property)을 갖는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)이다.
- <356> HSA는 운반 단백질(transporter protein)로서 기능할 수 있는 풍부한 혈장 단백질(abundant plasma protein)인 인간 혈청 알부민을 의미한다.
- <357> LSM은 밀도 구배 세포 분리(density gradient cell separation)를 수행하는데 이용되는 림프구 분리 배지(lymphocyte separation media)를 의미한다.
- <358> μg 은 마이크로그램(microgram)을 의미한다.
- <359> μl 는 마이크로리터(microliter)를 의미한다.
- <360> ml 는 밀리리터(milliliter)를 의미한다.
- <361> X는 곱셈(multiply), 다시 말하면, 농축 또는 희석을 의미한다.
- <362> 다른 적절한 대체 반응물, 산물과 제조업체가 본 명세서에 언급된 특성의 반응물, 산물과 제조업체 대신에 이용될 수 있다.
- <363> 광의의 발명 개념을 벗어나지 않으면서, 앞서 기술된 구체예가 변형될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예가 기술되었기 때문에, 추가적인 구체예, 개작, 변화, 변경과 필적하는 조정은 당업자에게 명백할 것이다. 이들 구체예는 첨부된 특허청구범위의 범위에 속하는 것으로 간주될 것이다.

도면의 간단한 설명

- <47> 도 1은 본 발명의 전반적인 방법과 공정을 예시하는 흐름도이다;
- <48> 도 2는 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <49> 도 3은 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <50> 도 4는 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <51> 도 5는 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <52> 도 6은 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <53> 도 7은 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <54> 도 8은 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <55> 도 9는 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 추가적인 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <56> 도 10은 월경 줄기 세포를 수집하고 동결보존하기 위한 본 발명의 다른 추가적인 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <57> 도 11은 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <58> 도 12는 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <59> 도 13은 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <60> 도 14는 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;

- <61> 도 15는 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <62> 도 16은 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 추가 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <63> 도 17은 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 추가 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <64> 도 18은 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <65> 도 19는 월경 줄기 세포를 수집하고 치료 용도를 위한 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다 ;
- <66> 도 20은 치료 용도동결보존에 대비하여된 월경 줄기 세포를 해동하기 위한 본 발명의 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <67> 도 21은 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <68> 도 22는 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <69> 도 23은 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <70> 도 24는 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <71> 도 25는 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 구체예의 보여주는 흐름도이다;
- <72> 도 26은 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <73> 도 27은 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <74> 도 28은 치료 용도를 위한 동결보존된 월경 줄기 세포를 제조하기 위한 본 발명의 또 다른 구체예를 보여주는 흐름도이다;
- <75> 도 29a 내지 29j는 하기에 열거된 바와 같이, 처리후 시료와 M2-01에 관련하여 아이소타입(isotype)에 대한 유동 세포 분석(flow cytometry analysis)의 결과를 도시한다. 처리후 시료는 대략 1 ml의 세포 현탁액으로서 M2-01로부터 수집하고, 유동 세포 분석을 위한 분석 튜브(analysis tube)에 위치시켰다. 이로부터 결과는 7AAD에 의한 측정에서, TNC 집단의 0.4%에서 CD117+ 세포의 농도, TNC 집단의 17.7%에서 CD44+ 세포의 농도, TNC 집단의 3.6%에서 CD166+ 세포의 농도, TNC 집단의 8.0%에서 CD105+ 세포의 농도, TNC 집단의 6.8%에서 CD90+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.1%에서 CD29+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.1%에서 CD34+ 세포의 농도, 그리고 95.4% 세포 생존능을 지시한다;
- <76> 도 30a 내지 30e는 본 발명의 CD117 선택 방법에 의해 획득된 양성 분획물(positive fraction) 내에서 세포에 관련하여 유동 세포 분석의 결과를 도시한다. CD117 선택후, 대략 1 ml의 세포 현탁액을 수집하고 유동 세포 분석을 위한 분석 튜브 내에 위치시켰다. 이로부터 결과는 7AAD에 의한 측정에서, TNC 집단의 7.2%에서 CD117+ 세포의 농도, TNC 집단의 93.6%에서 CD44+ 세포의 농도, 그리고 95.8% 세포 생존능을 지시한다. 이들 결과는 본 발명의 유동 세포 분석에 따라서 처리 시료를 이동시키고, IgG 항체의 아이소타입과 함께 이동된 처리후 시료로 획득된 배경 계산(background calculation)을 뺄셈함으로써 산정되었다;
- <77> 도 31a 내지 31cc는 아래에 열거된 바와 같이, 처리후 시료와 M2-02C에 관련하여 아이소타입에 대한 유동 세포 분석의 결과를 도시한다. 처리후 시료는 대략 1 ml의 세포 현탁액으로서 수집하고 유동 세포 분석을 위한 분석 튜브 내에 위치시켰다. 이로부터 결과는 7AAD에 의한 측정에서, TNC 집단의 0.2%에서 CD117+ 세포의 농도, TNC

집단의 1.8%에서 CD44+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.1%에서 CD166+ 세포의 농도, TNC 집단의 1.1%에서 CD105+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.4%에서 CD90+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.5%에서 CD29+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.0%에서 CD34+ 세포의 농도, 그리고 99.5% 세포 생존율을 지시한다;

<78> 도 32a 내지 32cc는 본 발명의 CD117 선택 방법에 의해 획득된 양성 분획물(positive fraction) 내에서 세포에 관련하여 유동 세포 분석의 결과를 도시한다. 양성 분획물은 대략 1 ml의 세포 현탁액을 수집하고 유동 세포 분석을 위한 분석 튜브 내에 위치시켰다. 이로부터 결과는 7AAD에 의한 측정에서, TNC 집단의 18.40%에서 CD117+ 세포의 농도, TNC 집단의 93.0%에서 CD44+ 세포의 농도, TNC 집단의 89.2%에서 CD166+ 세포의 농도, TNC 집단의 81.4%에서 CD105+ 세포의 농도, TNC 집단의 78.1%에서 CD90+ 세포의 농도, TNC 집단의 73.6%에서 CD29+ 세포의 농도, TNC 집단의 0.1%에서 CD34+ 세포의 농도, 그리고 91.9% 세포 생존율을 지시한다. 이들 결과는 본 발명의 유동 세포 분석에 따라서 처리 시료를 이동시키고, IgG 항체의 아이소타입과 함께 이동된 처리후 시료로 획득된 배경 계산(background calculation)을 뺄셈함으로써 산정되었다;

<79> 도 33은 본 명세서에서 더욱 상세하게 기술된 바와 같은 수차례의 계대 배양, 동결보존, 해동, 그리고 해동후 수송(passage) 이후에 M2-03E에 관련하여 세포의 유동 세포 분석의 결과를 도시한다. 유동 세포 분석 결과는 이들 세포가 MHC I, CD44, CD29, CD90, SSEA-4, CD105, CD49f, CD9, CD166, CD166과 CXCR4를 발현하고 CD133, MHC II, CD34, CD45와 CD38을 거의 또는 전혀 발현하지 않는다는 것을 증명한다.

<80> 도 34a 내지 34f는 월경 줄기 세포 M2-03E가 도 34a에 도시된 바와 같이 CD117에 대하여, 도 34c에 도시된 바와 같이 SSEA-4에 대하여, 그리고 도 34e에 도시된 바와 같이 CD117과 SSEA-4 공동-국지화(co-localization)에 대하여 양성 염색된다는 것을 보여준다. 음성 대조(negative control)는 도 34b에 도시된 바와 같이 CD117에 대하여, 도 34d에 도시된 바와 같이 SSEA-4에 대하여, 또는 도 34f에 도시된 바와 같이 CD117과 SSEA-4 공동-국지화(co-localization)에 대하여 양성 염색되지 않았다;

<81> 도 35a와 35b는 월경 줄기 세포 M2-03E가 신속하게 성장하고 다능성(multipotent) 마커를 발현한다는 것을 보여준다. 도 35a는 월경 줄기 세포 M2-03E가 대략 24 시간 내지 대략 36 시간의 배가 시간(doubling time)으로 동결보존 이전 배양에서 신속하게 성장한다는 것을 보여준다. 이러한 신속한 성장은 50,000개 세포에서 48 백만개 세포로 8배 배가(doubling) 확장을 가능하게 하였다. 도 35b는 월경 줄기 세포 M2-03E가 RT-PCR(L, ladder; W, 물; ESC, 배아 줄기 세포; P12, 12회 계대 배양)에 의한 측정에서, 대략 12회 계대 배양까지 RNA 수준에서 Oct-4를 발현한다는 것을 보여준다;

<82> 도 36a 내지 36g는 월경 줄기 세포 M2-03E가 신경 조직(neural tissue)으로 분화한다는 것을 보여준다. 월경 줄기 세포는 도 36a 내지 36c에 도시된 바와 같이, 04와 GalC를 발현하는 희소돌기아교세포(oligodendroglial cell)로 분화하도록 신경 유도되었다. 이들 월경 줄기 세포는 또한, 도 36d에 도시된 바와 같이 Map-2, 도 36e에 도시된 바와 같이 Tub-3, 그리고 도 36f에 도시된 바와 같이 Vimentin을 발현하였다. 이들 분화된 세포의 RT-PCR 결과는 신경 세포에 전형적인 RNA 수준 발현을 보여준다, RT-PCR: L, ladder; W, 물; B, 뇌 대조; 신경 유도된 월경 줄기 세포;

<83> 도 37a 내지 37d는 월경 줄기 세포 M2-03E가 심장 조직(cardiac tissue)으로 분화한다는 것을 보여준다. 월경 줄기 세포는 8 μ M Aza로 처리하고, 도 37b에서 면역세포화학(immunocytochemistry)을 통하여 나타나는, 액틴(actin)의 강한 발현을 보였다. 도 37a에 도시된 바와 같은 트로포닌(troponin) 발현과 도 37c에 도시된 바와 같은 코넥신(connexin) 43 발현은 800 μ M SNAP로 세포를 처리함으로써 자극하였다. RT-PCR에서, 도 37d에 도시된 바와 같은 심장 분화(cardiac differentiation)가 확증되었다, RT-PCR: L, ladder; W, 물; H, 심장 대조; 유도된 심장;

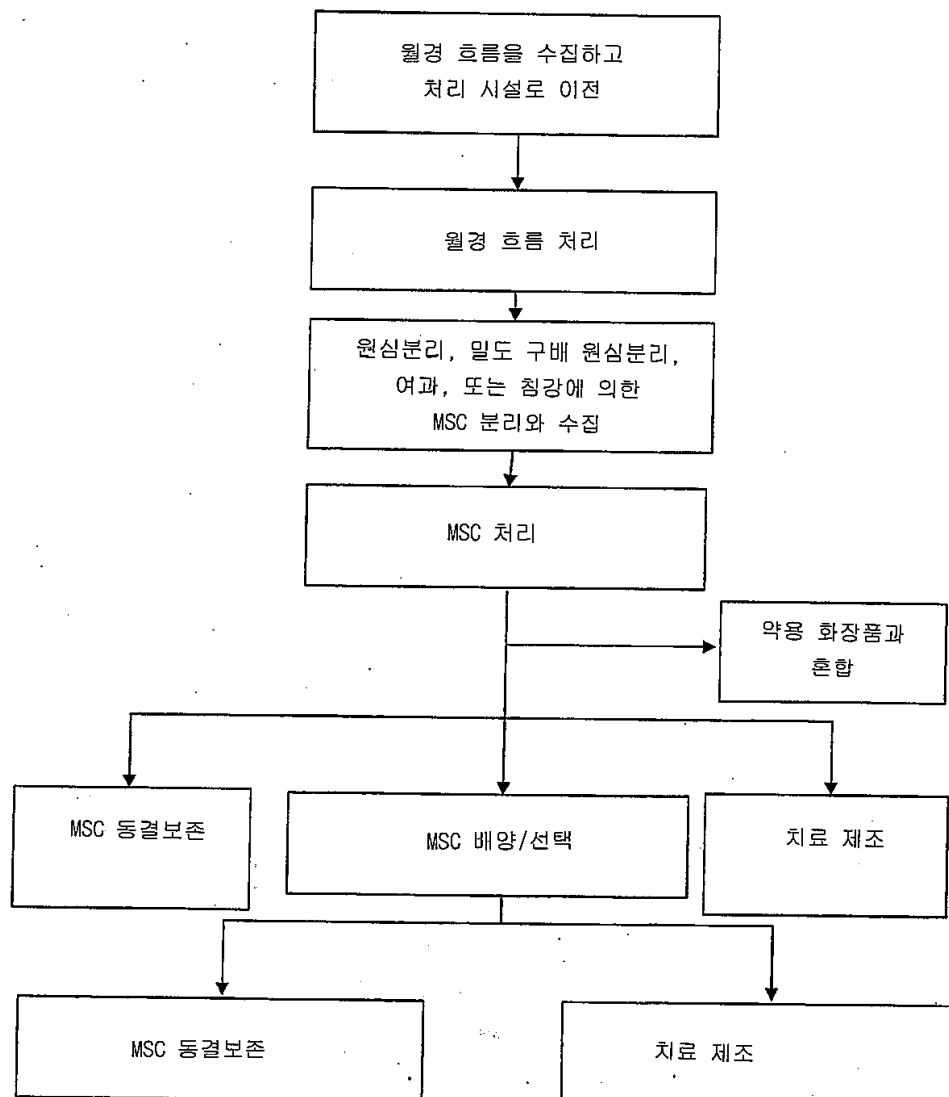
<84> 도 38a 내지 38f는 월경 줄기 세포 M2-03E가 중배엽(mesoderm) 타입 조직으로 분화한다는 것을 보여준다. 지방 공포(fat vacuole)에 대하여 오일 레드(oil red) O로 염색된 세포는 도 38a에 도시된 바와 같은 대조와 비교하여, 도 38b에 도시된 바와 같이 유도되는 지방 조직(adipose tissue)으로의 분화를 지시한다. 알시안 블루(alcian blue)로 염색된 세포는 도 38c에 도시된 바와 같은 대조와 비교하여, 도 38d에 도시된 바와 같이 유도되는 연골형성 조직(chondrogenic tissue)으로의 분화를 지시한다. 알리자린 레드(alizarin red) S로 염색된 세포는 도 38e와 비교하여, 도 38f에 도시된 바와 같은 칼슘 침착물(calcium deposit)의 존재를 지시한다;

<85> 도 39는 M2-03E의 월경 줄기 세포가 해동후 배양액(post-thaw culture)의 12회 계대 배양에서 텔로머라제(telomerase) 활성을 발현한다는 것을 보여주는 그래프이다; hESC, 인간 배아 줄기 세포; MEF, 생쥐 배아 섬유아세포(생쥐 embryonic fibroblast); MenSCs P12;

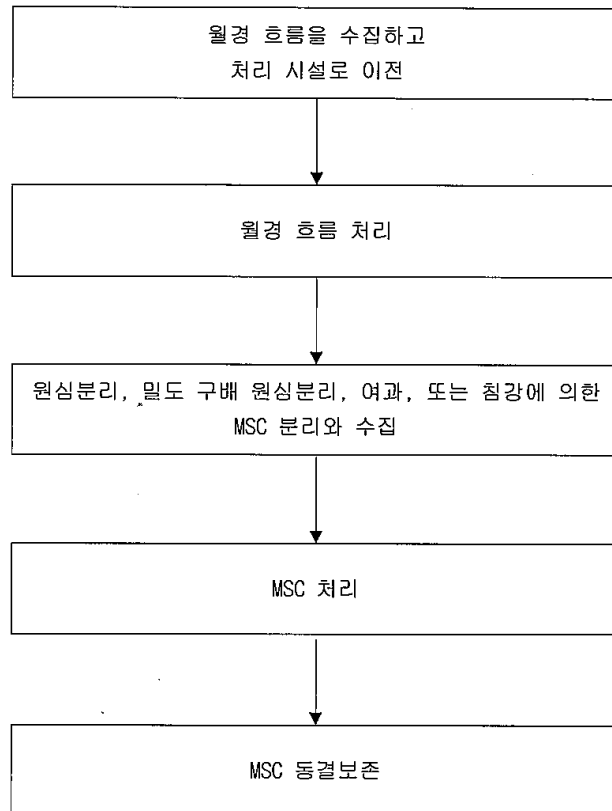
- <86> 도 40은 본 발명의 월경 줄기 세포 수집 방법과 연관된 변수를 분석하기 위하여, 3개 군으로 분할되고 미리 설정된 조건 하에 수집된 161개 시료로 수행된 연구의 결과를 보여주는 그래프이다. 상기 연구는 항생제를 포함하거나 포함하지 않는 수집 배지를 이용하고, 얼음과 함께 또는 얼음 없이 월경 흐름 시료를 수송하는 효과를 결정하기 위하여 수행되었다. 도 40은 전체 유핵 세포수(total nucleated cell count) 분석 결과가 3개 군에서 수집된 전체 시료에서, 평균적으로 대략 7.9 백만개 세포/수집된 시료임을 보여준다;
- <87> 도 41은 도 40에서 언급된 연구의 결과를 보여주는 그래프이다. 도 41은 처리후 시료에서 세포 생존능(cell viability)이 3개 군에서 수집된 전체 시료에서 평균적으로 대략 74% 생존능임을 보여준다;
- <88> 도 42는 도 40에서 언급된 연구의 결과를 보여주는 그래프이다. 도 42는 3개 군에서 수집된 전체 시료에 대한 평균 온도(average temperature)가 평균적으로 대략 15℃임을 보여준다;
- <89> 도 43은 도 40에서 언급된 연구의 결과를 보여주는 그래프이다. 도 43은 3개 군에서 수집된 전체 시료에 대한 평균 시료 체적(average sample volume)이 평균적으로 대략 11 ml(대략 1 ml의 월경 흐름 시료와 대략 10 ml의 수집 배지)임을 보여준다;
- <90> 도 44는 도 40에서 언급된 연구의 결과를 보여주는 그래프이다. 도 44는 수집에서부터 처리 시설에서 수령까지 계산된 평균 시료 연령(average sample age)이 대략 5 시간 미만에서부터 140 시간 초과까지 변동한다는 것을 보여준다.

도면

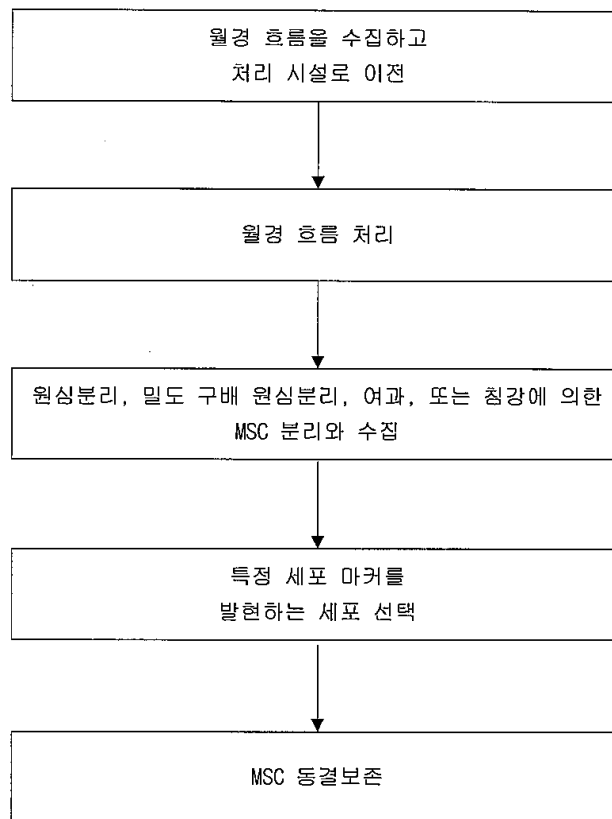
도면1



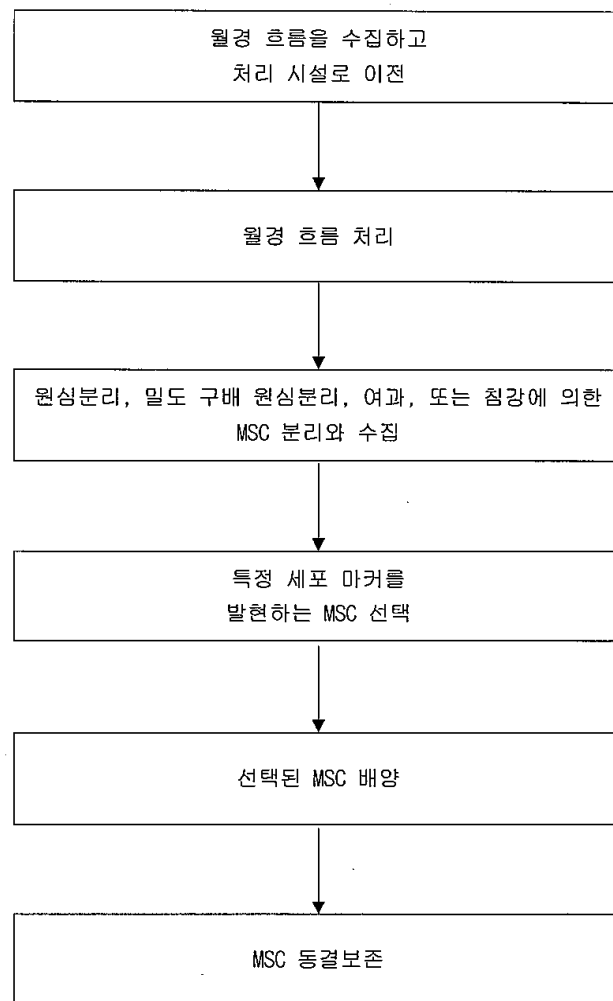
도면2



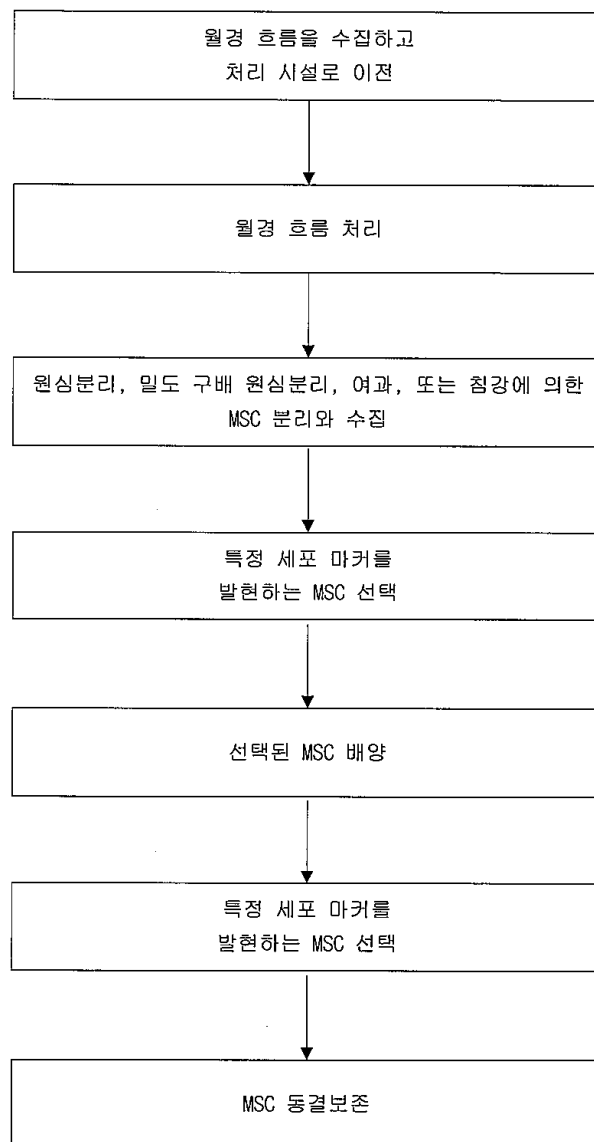
도면3



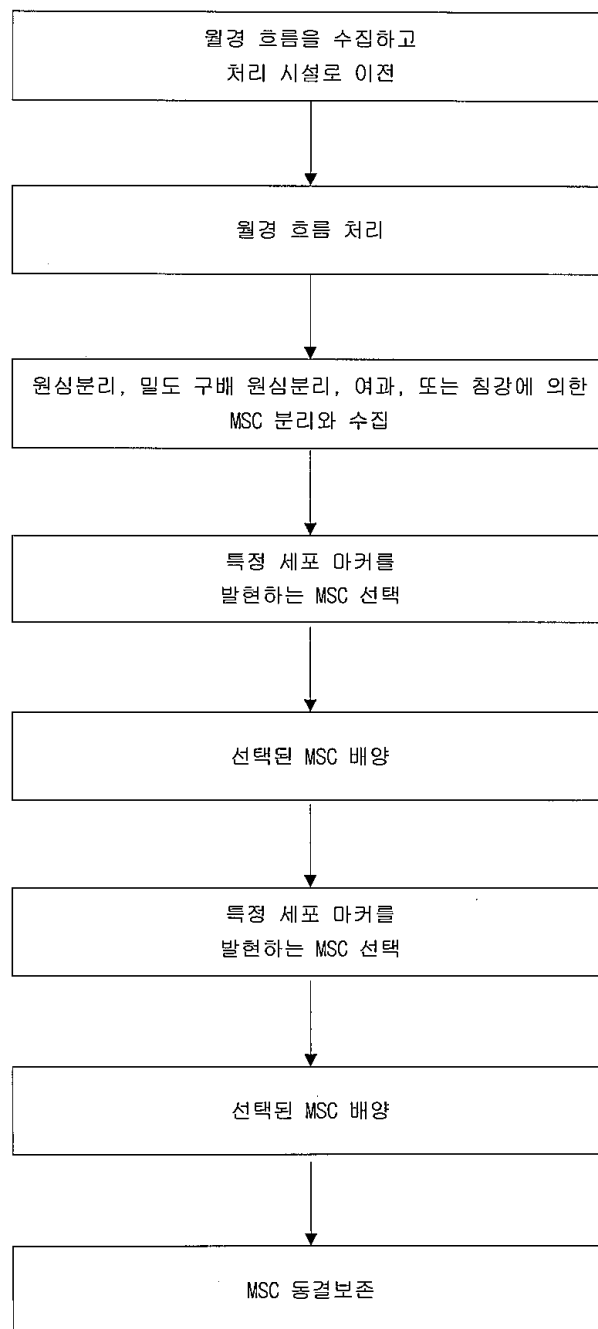
도면4



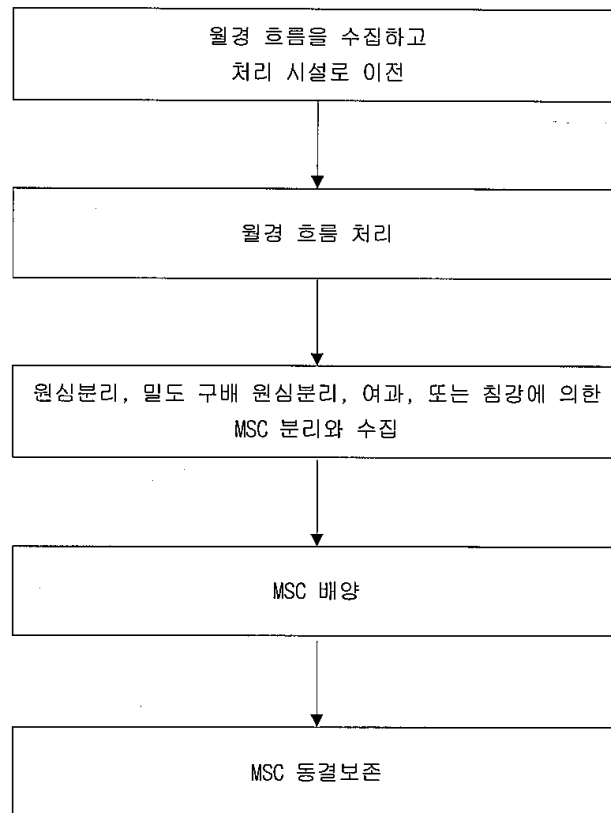
도면5



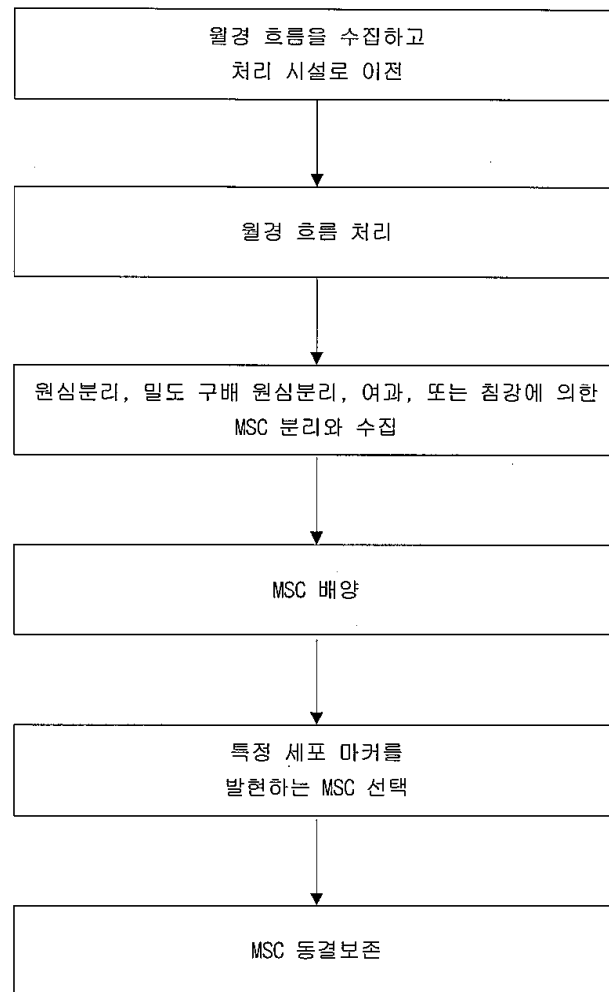
도면6



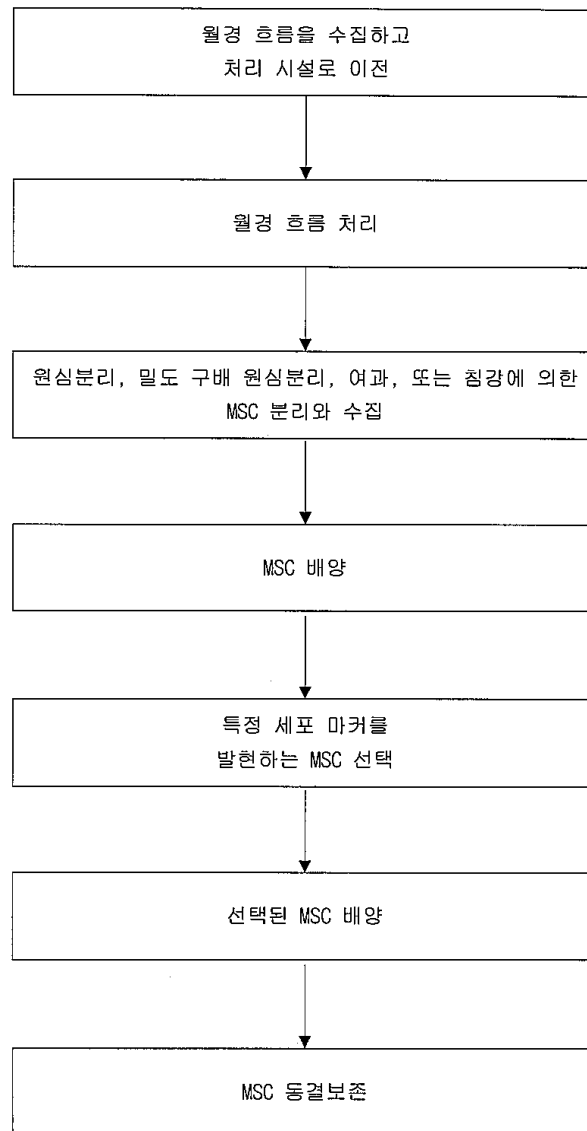
도면7



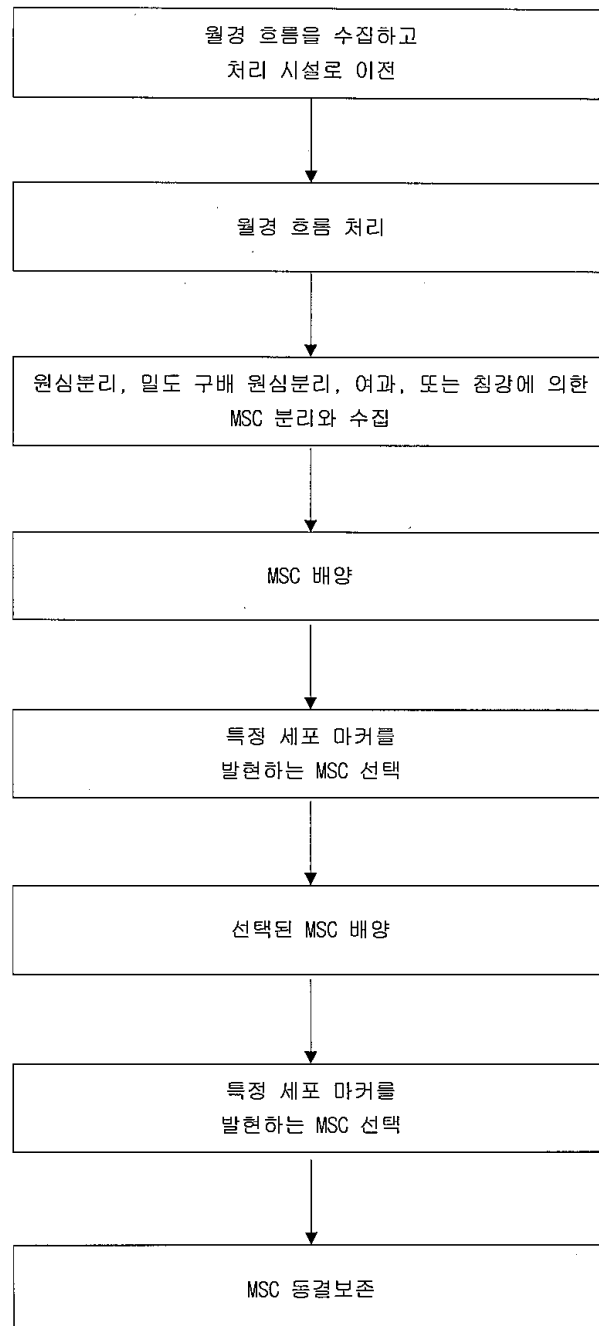
도면8



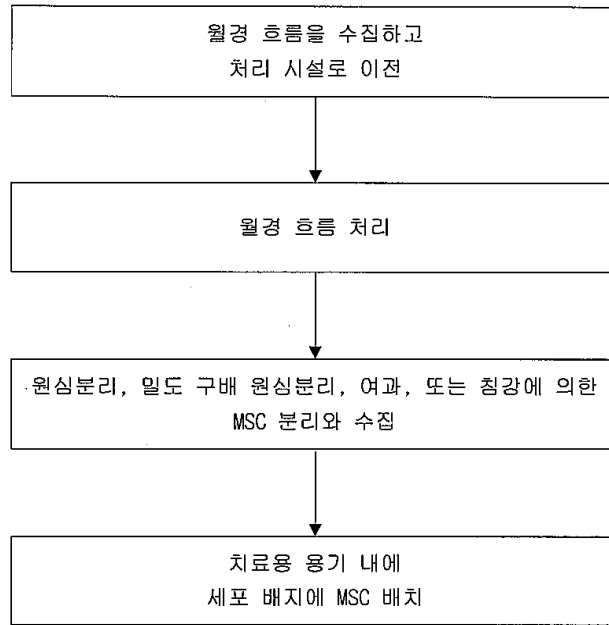
도면9



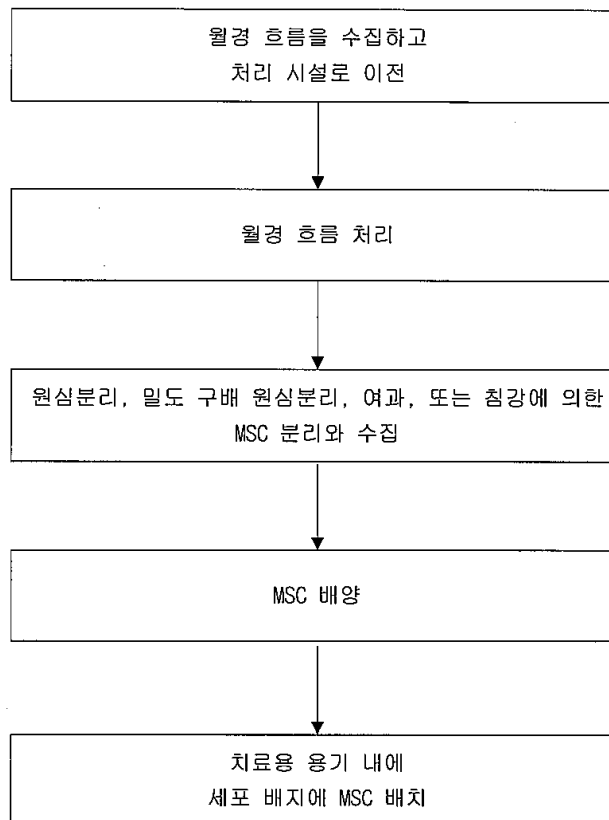
도면10



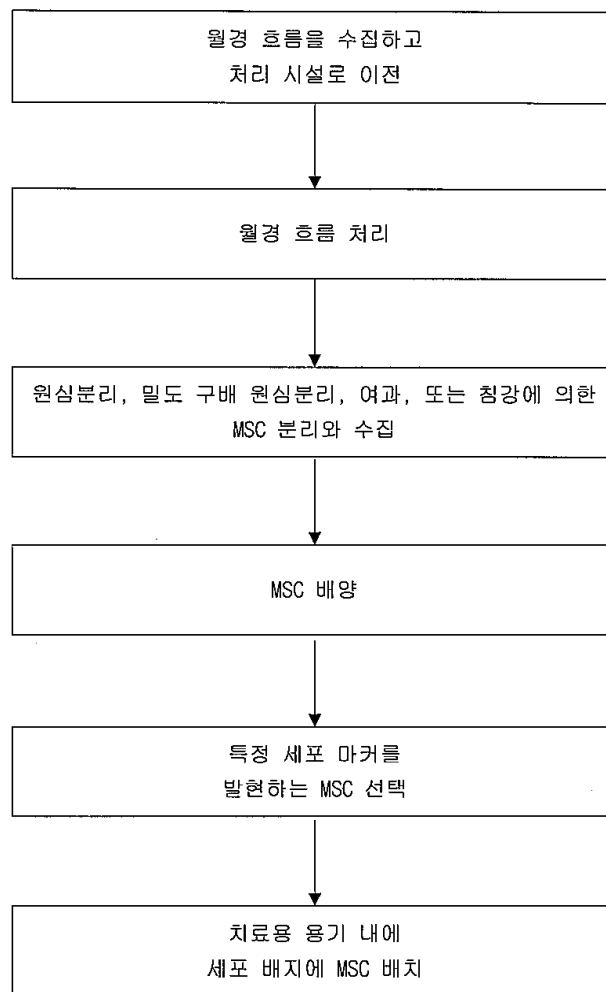
도면11



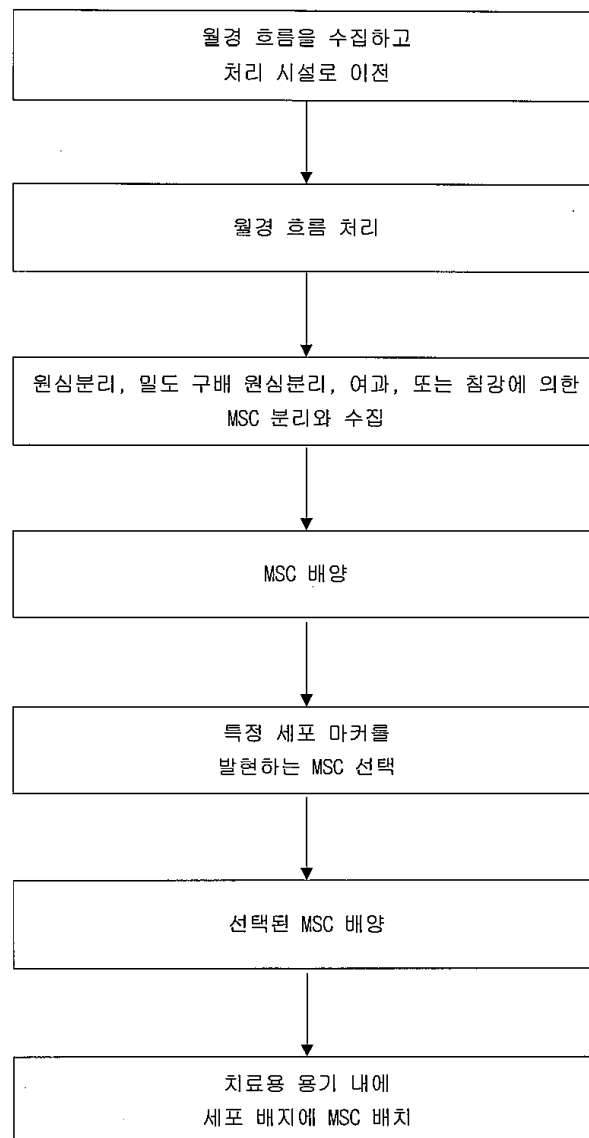
도면12



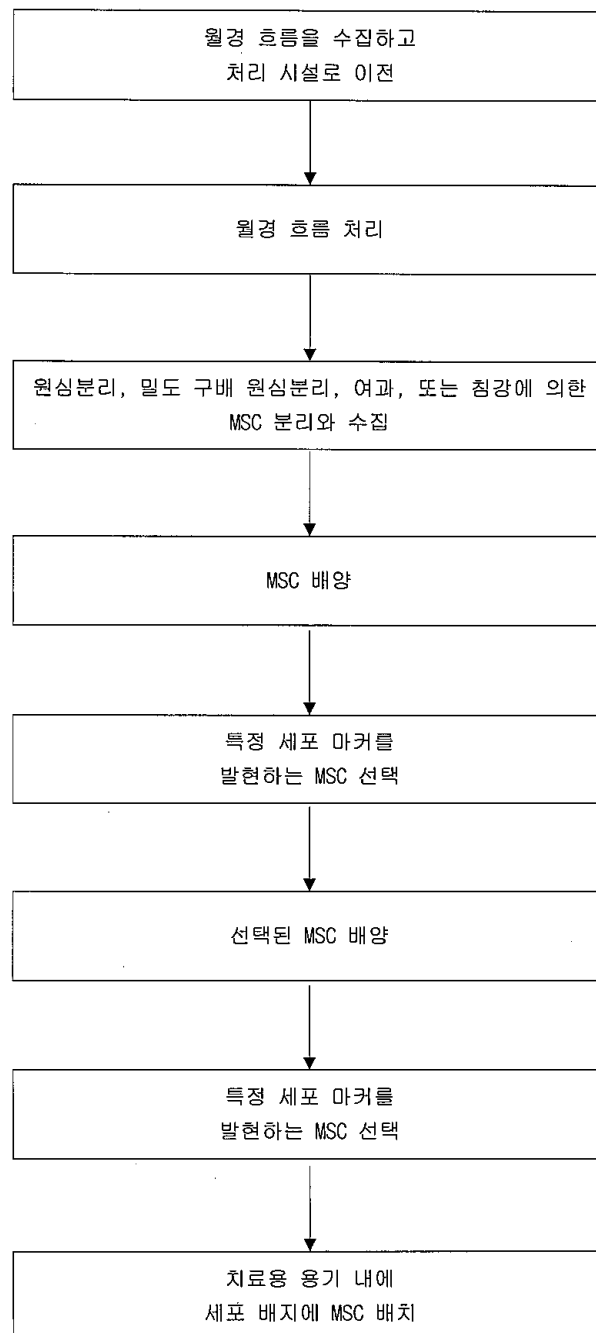
도면13



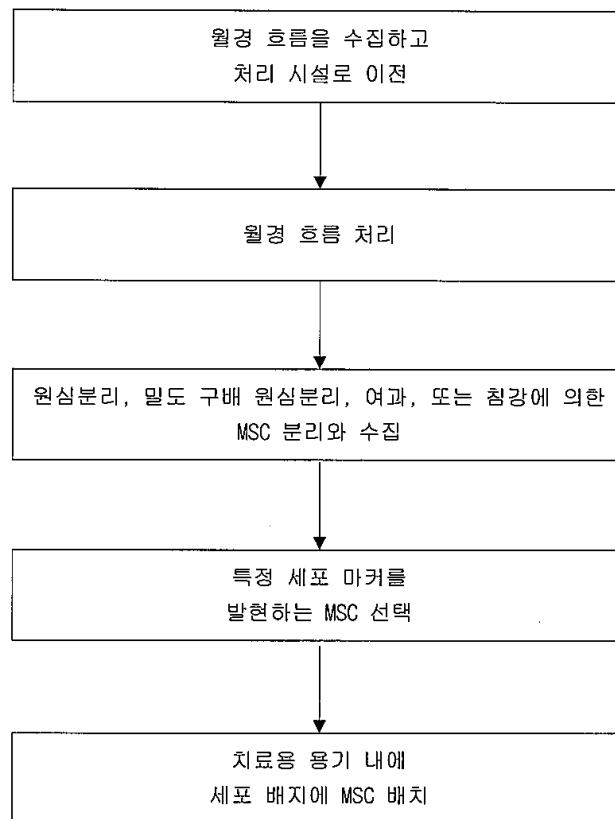
도면14



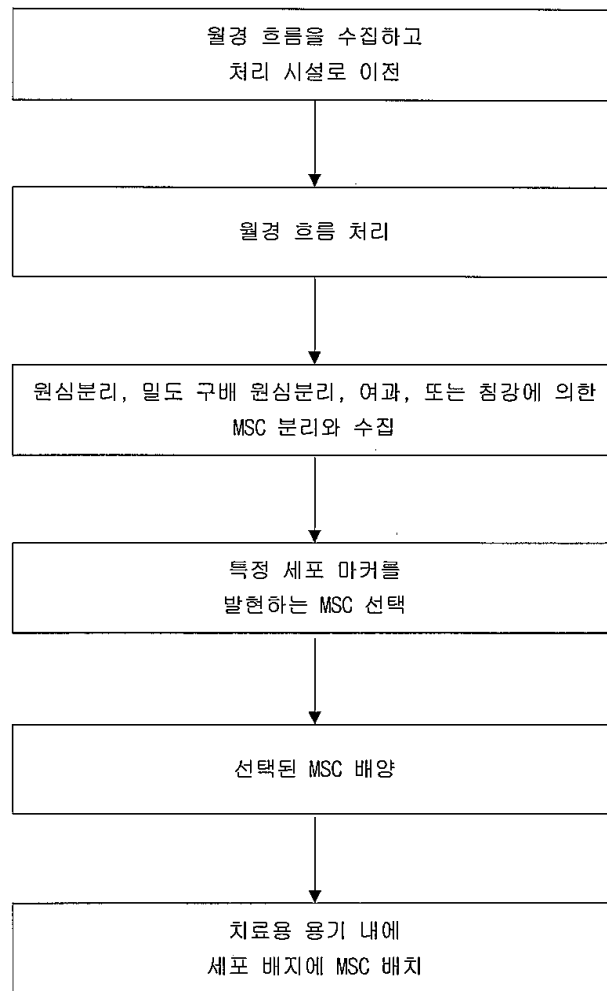
도면15



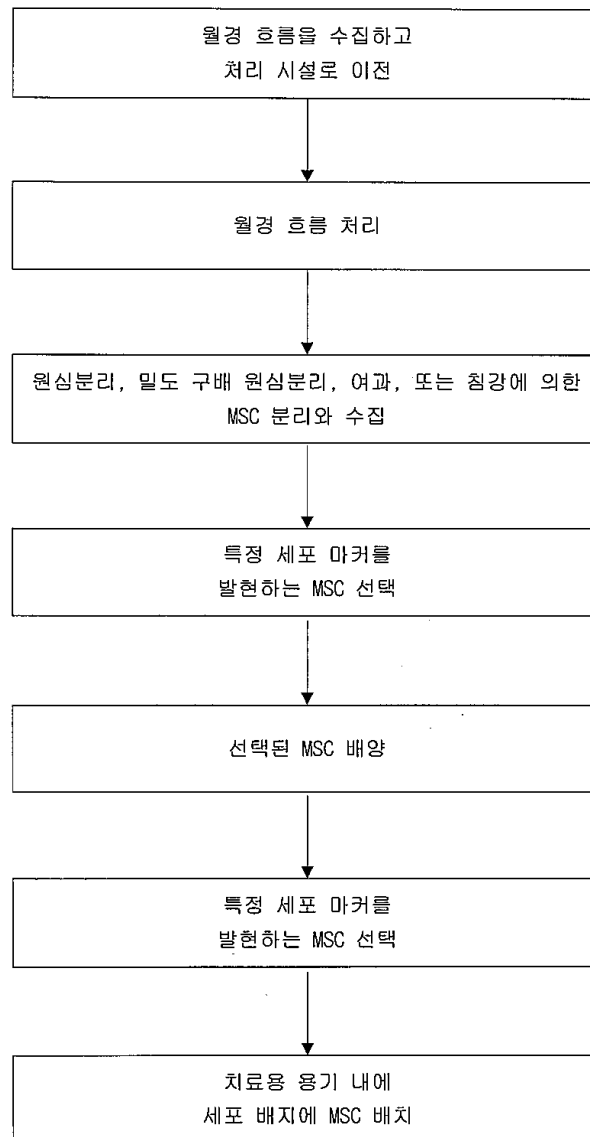
도면16



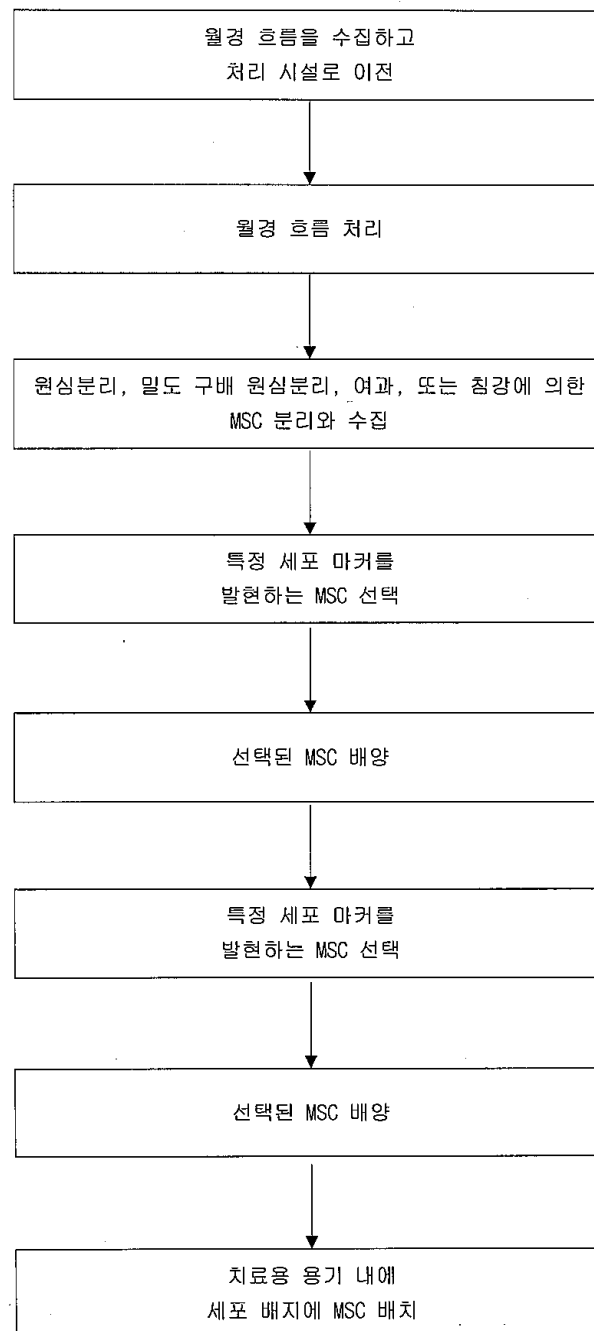
도면17



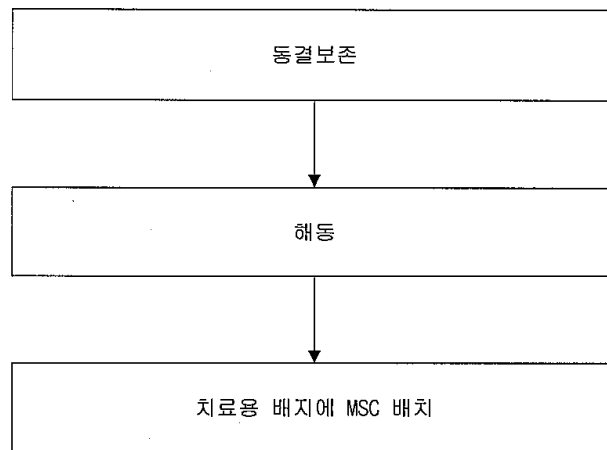
도면18



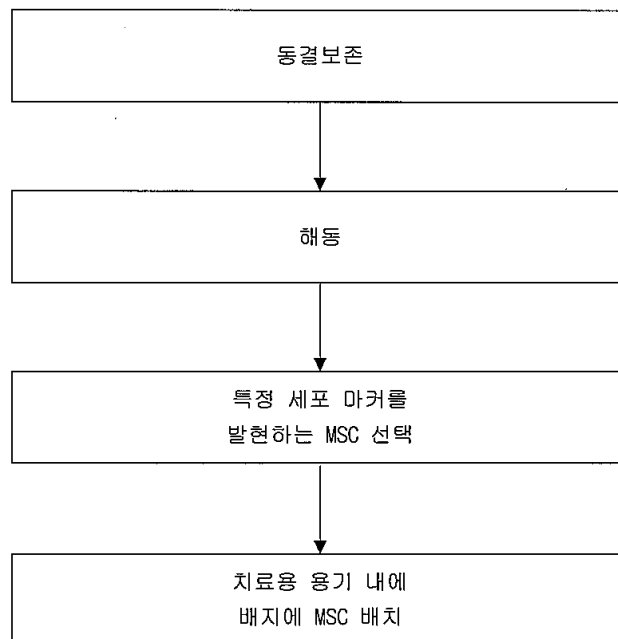
도면19



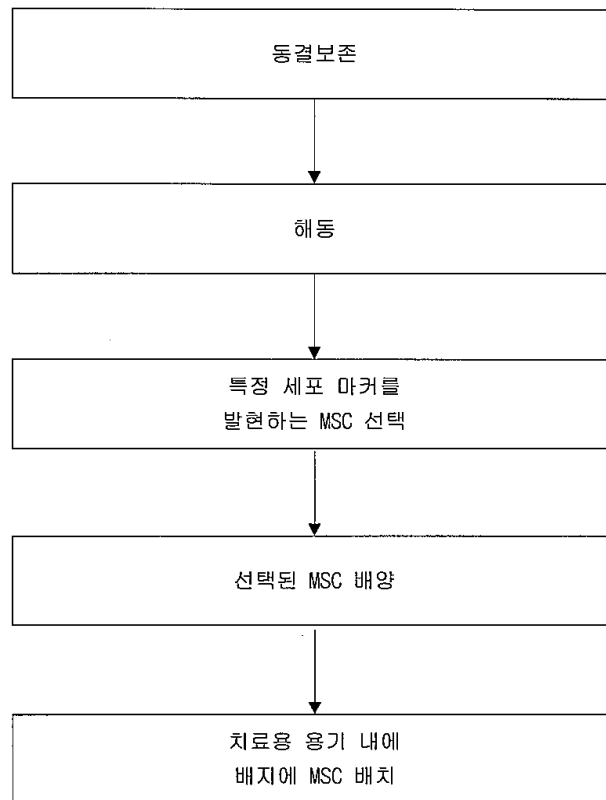
도면20



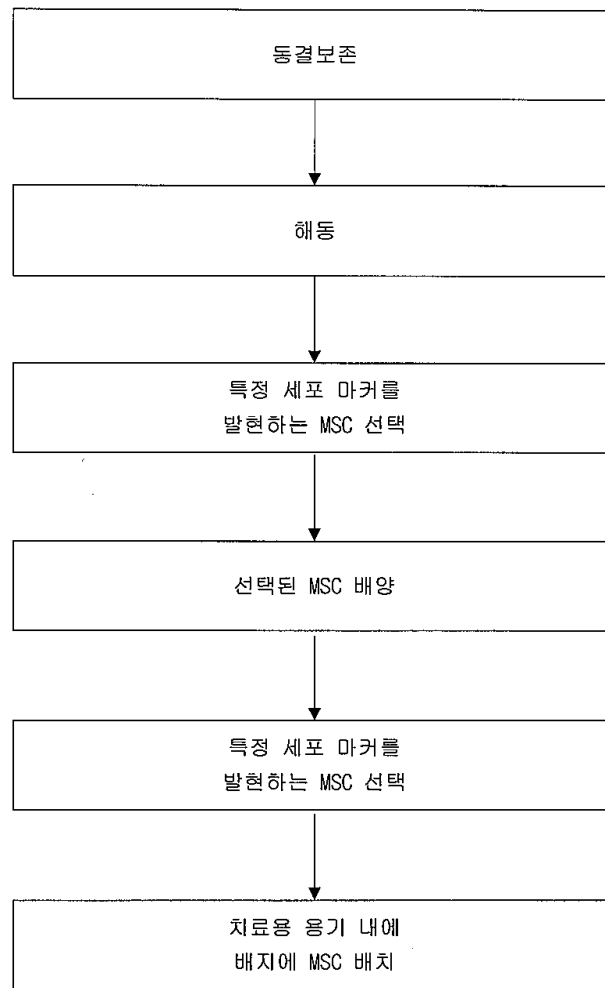
도면21



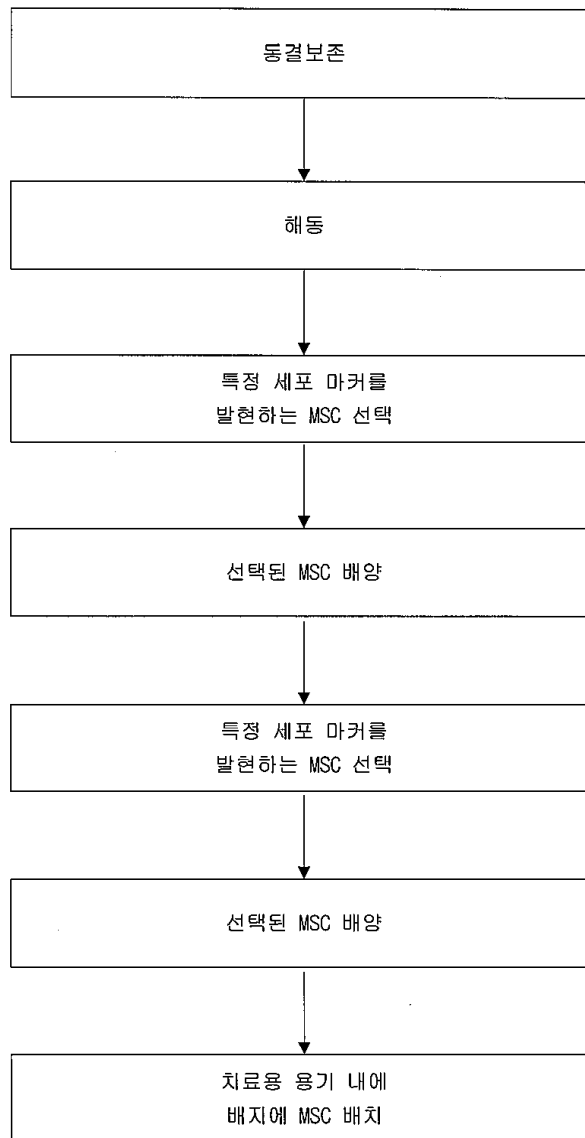
도면22



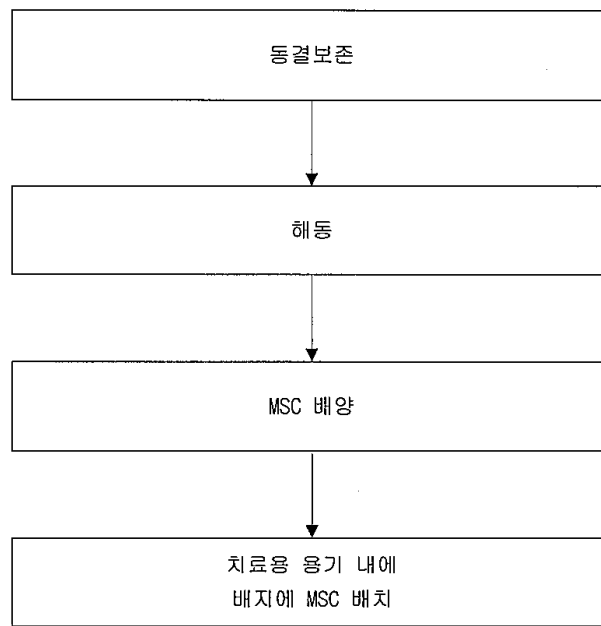
도면23



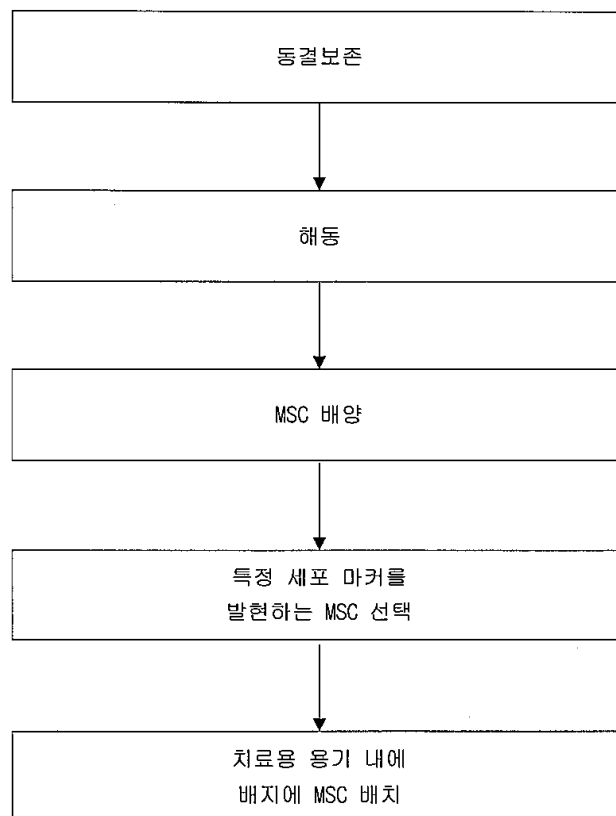
도면24



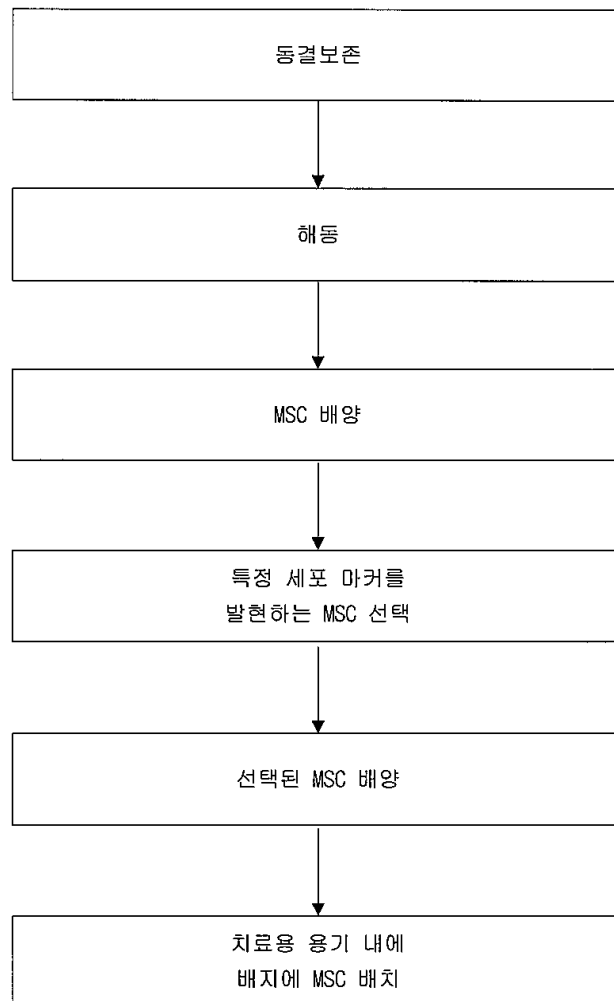
도면25



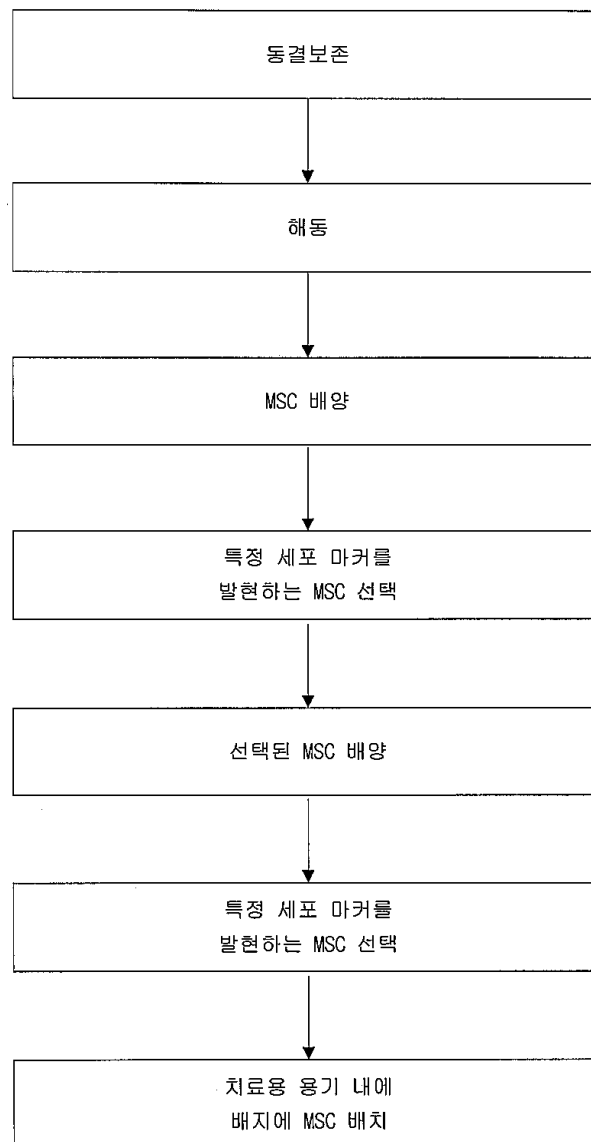
도면26



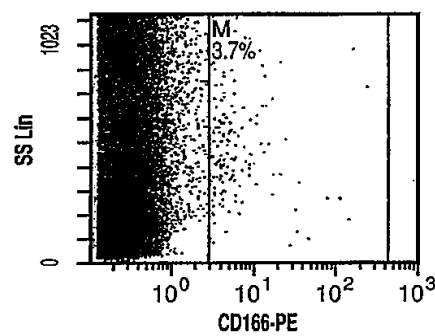
도면27



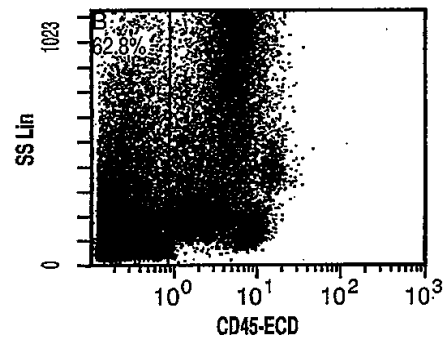
도면28



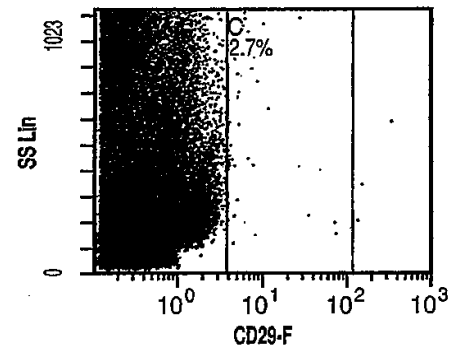
도면29a



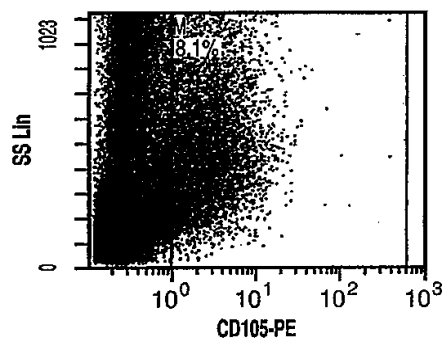
도면29b



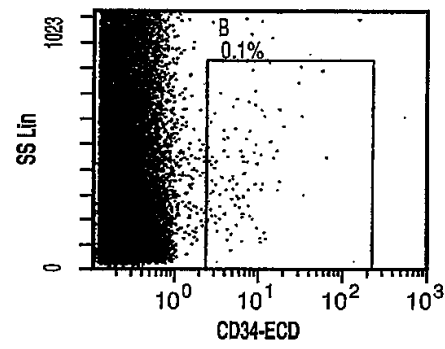
도면29c



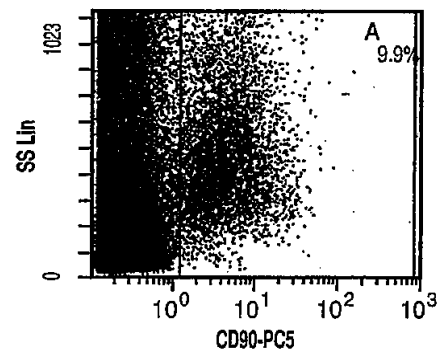
도면29d



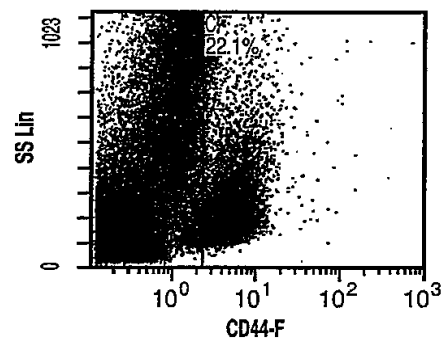
도면29e



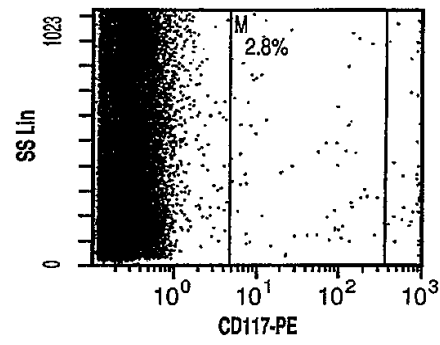
도면29f



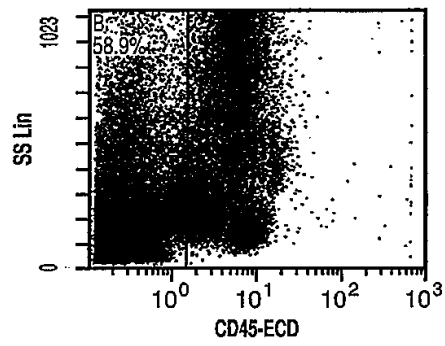
도면29g



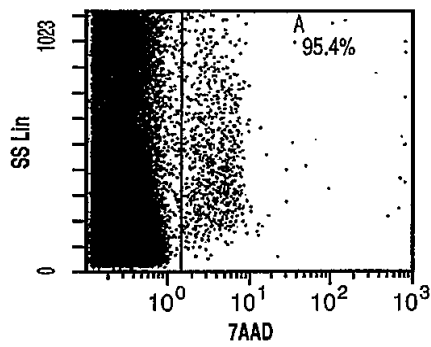
도면29h



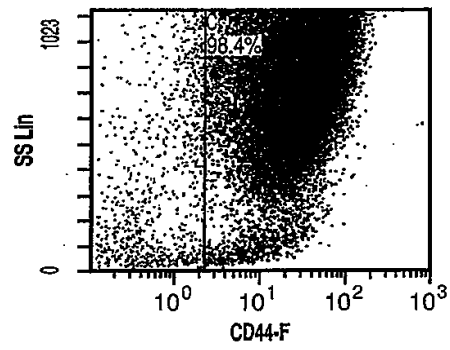
도면29i



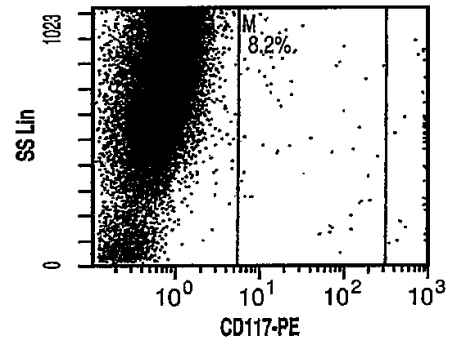
도면29j



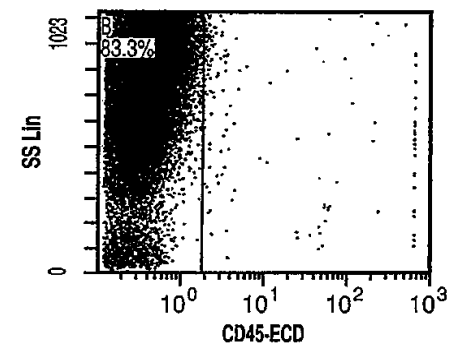
도면30a



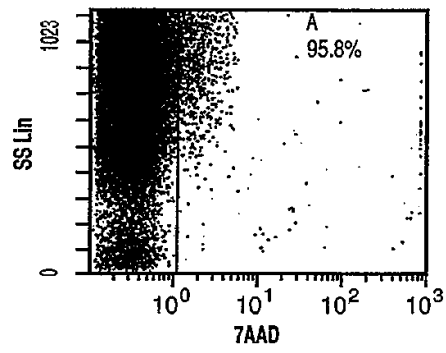
도면30b



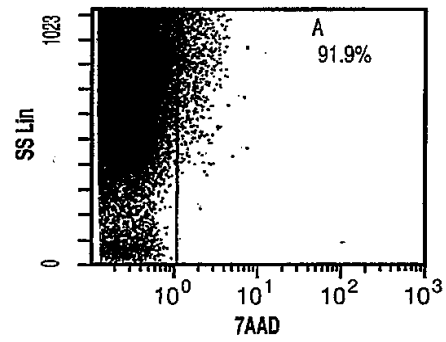
도면30c



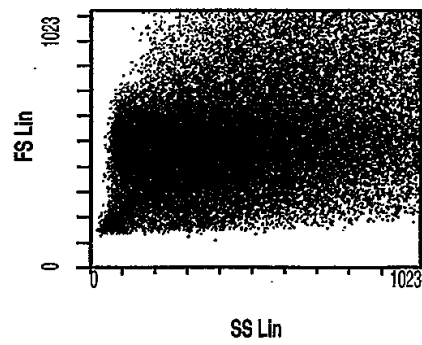
도면30d



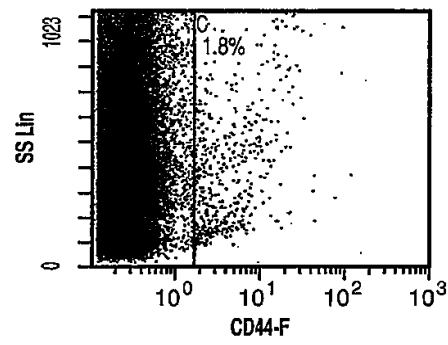
도면30e



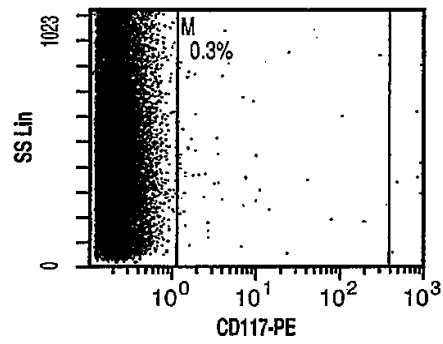
도면31a



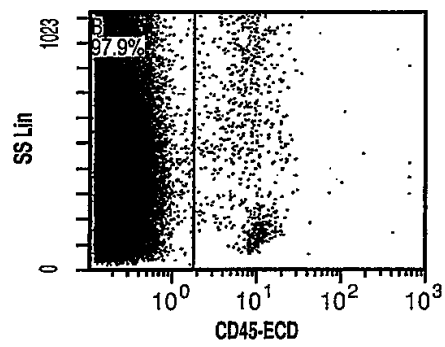
도면31b



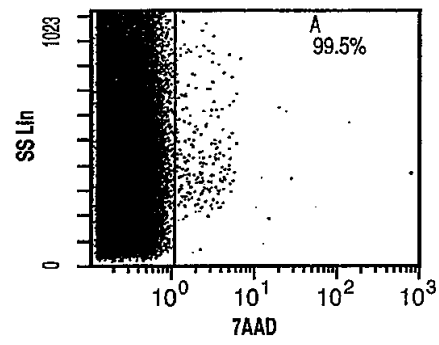
도면31c



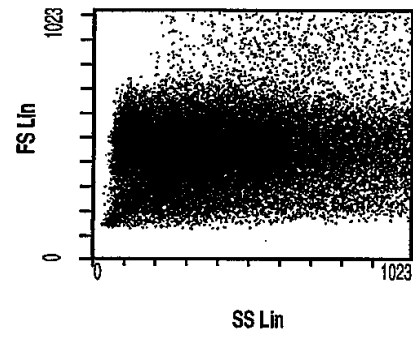
도면31d



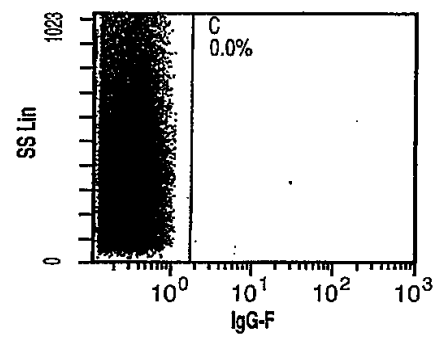
도면31e



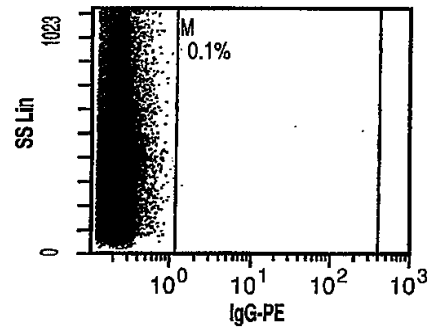
도면31f



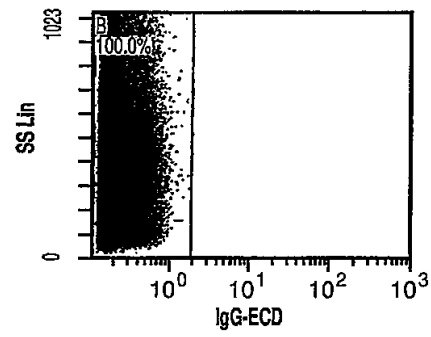
도면31g



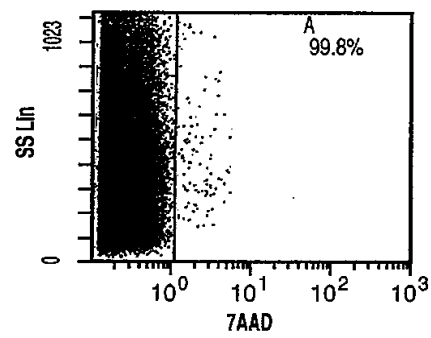
도면31h



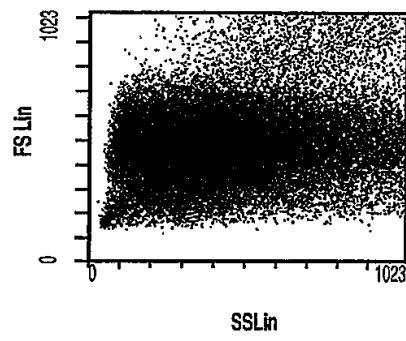
도면31i



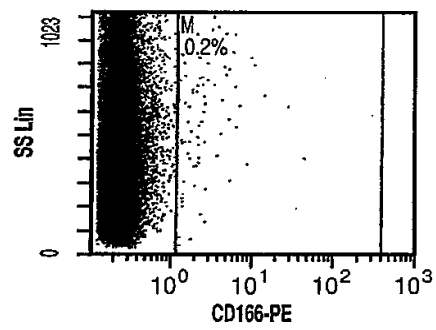
도면31j



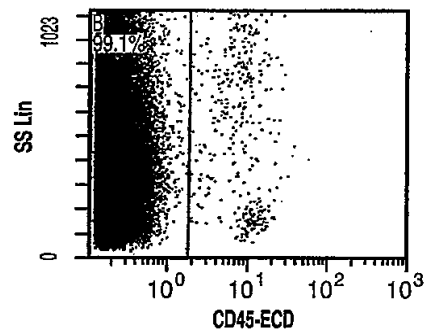
도면31k



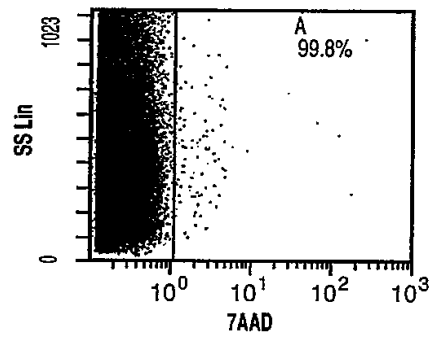
도면31l



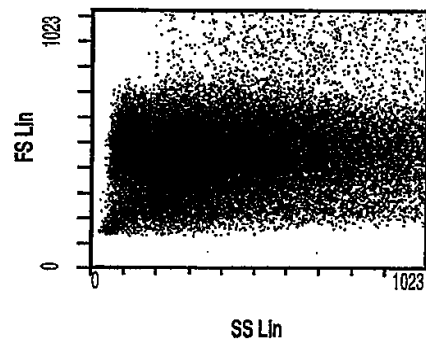
도면31m



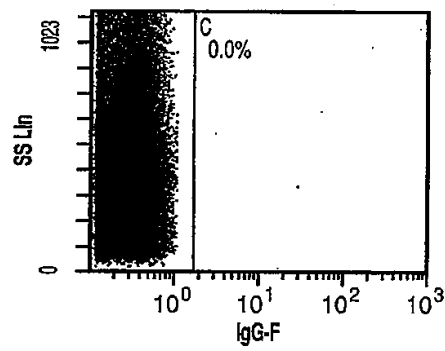
도면31n



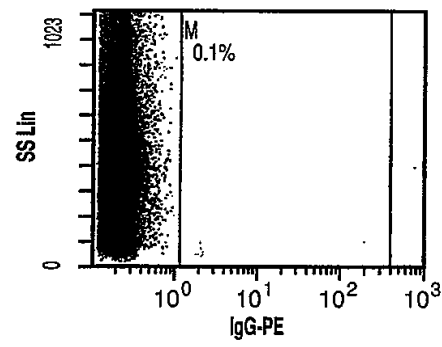
도면31o



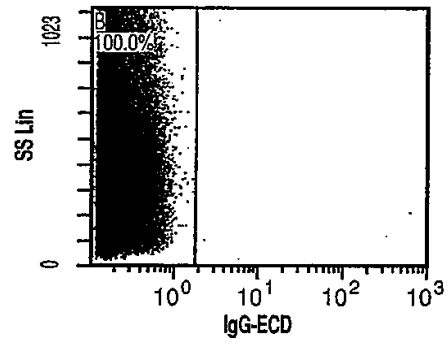
도면31p



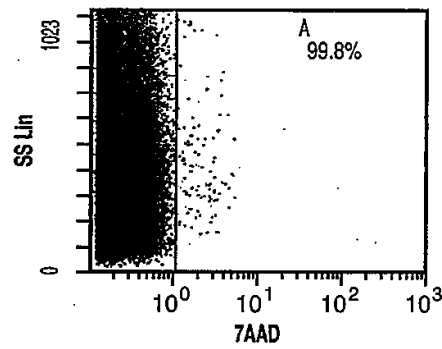
도면31q



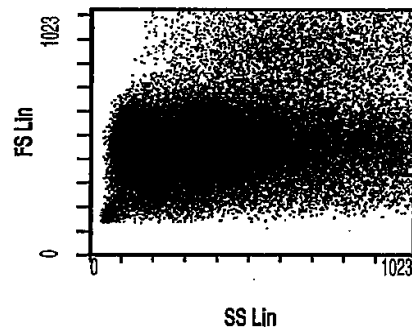
도면31r



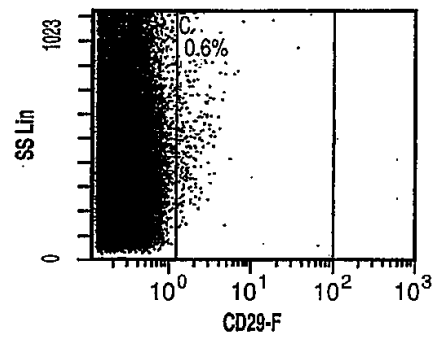
도면31s



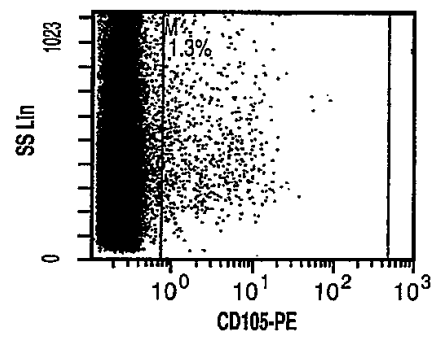
도면31t



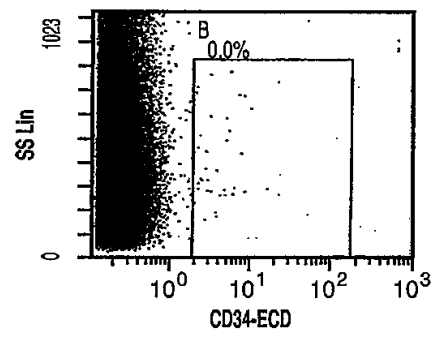
도면31u



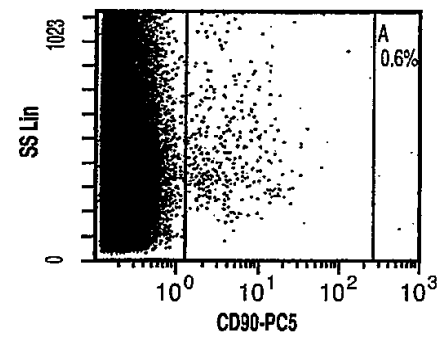
도면31v



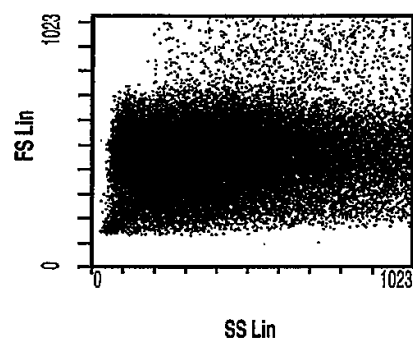
도면31w



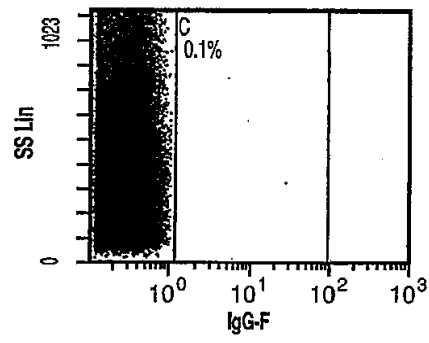
도면31x



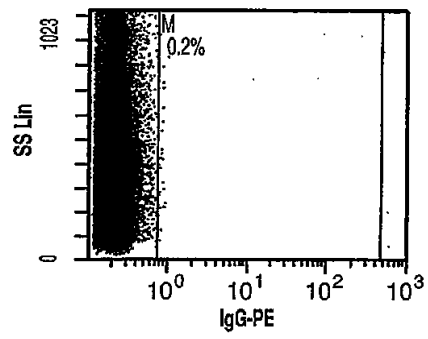
도면31y



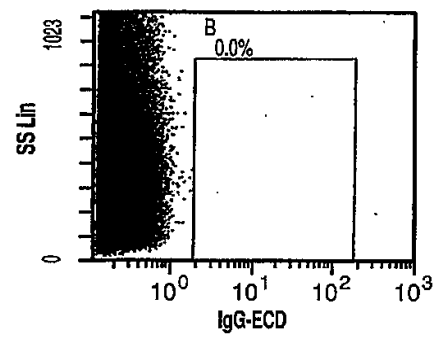
도면31z



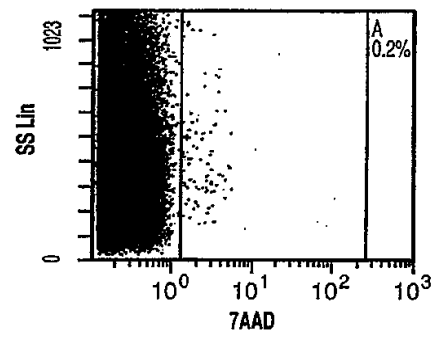
도면31aa



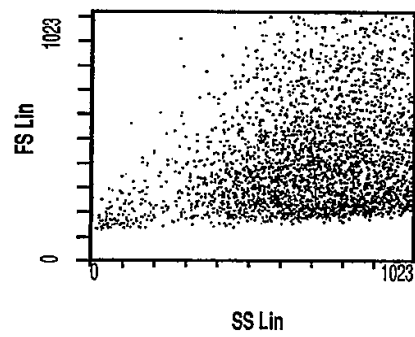
도면31bb



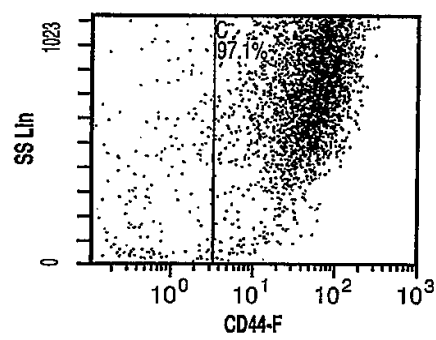
도면31cc



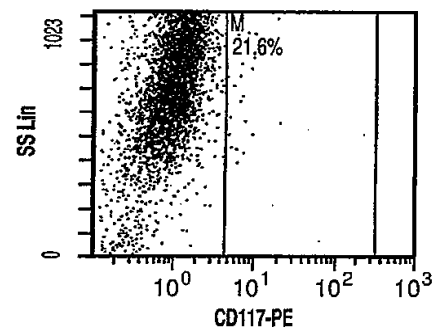
도면32a



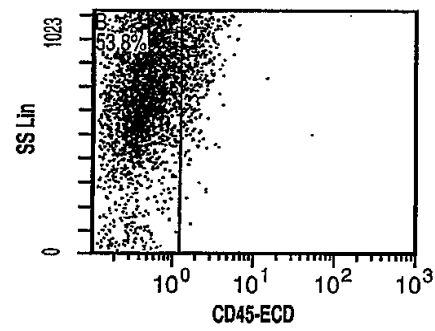
도면32b



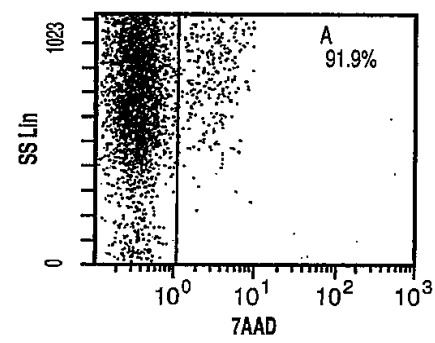
도면32c



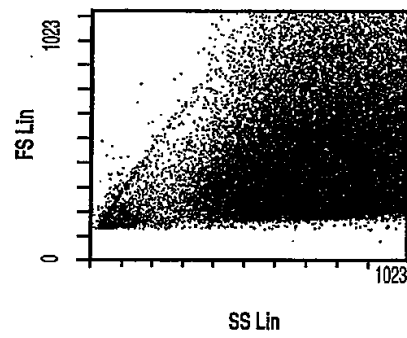
도면32d



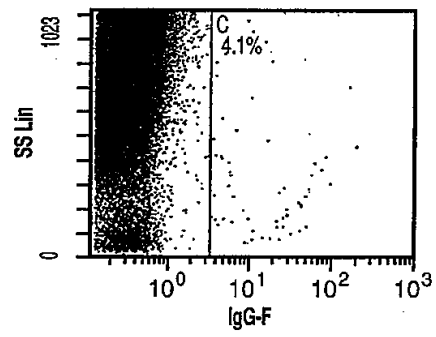
도면32e



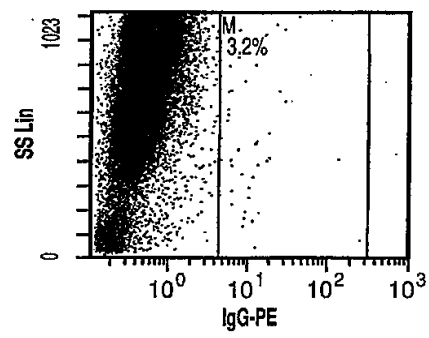
도면32f



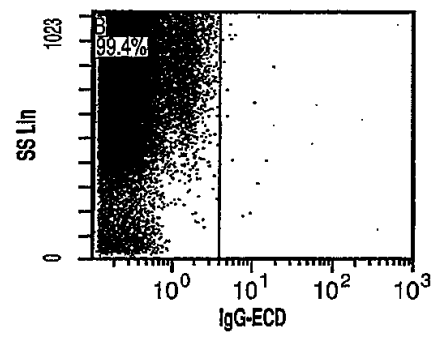
도면32g



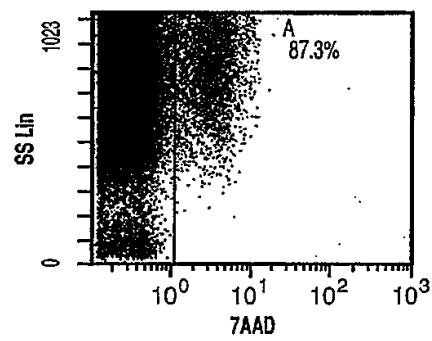
도면32h



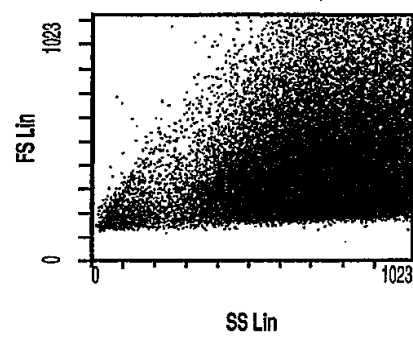
도면32i



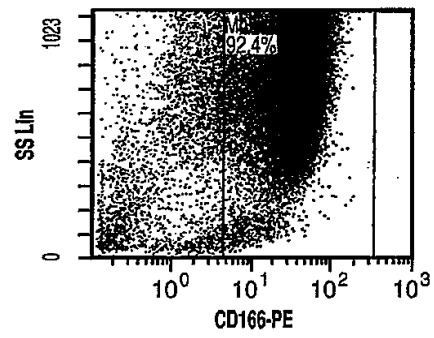
도면32j



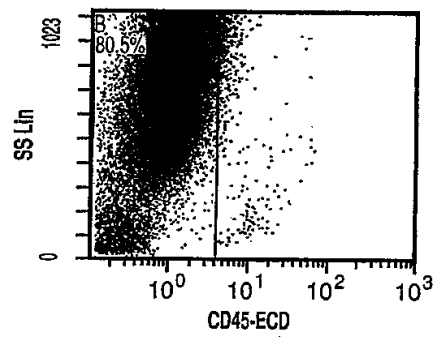
도면32k



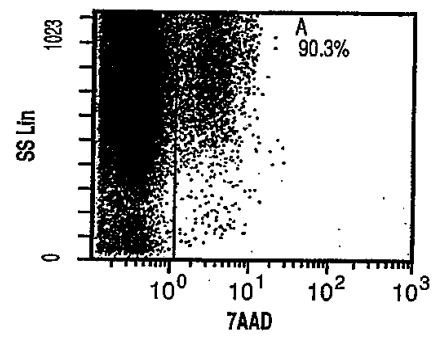
도면32l



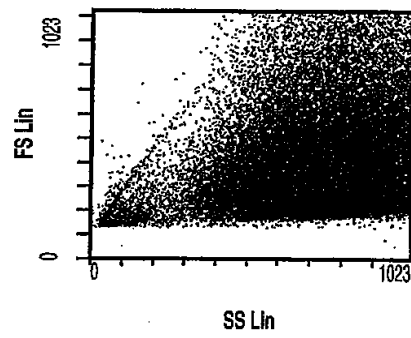
도면32m



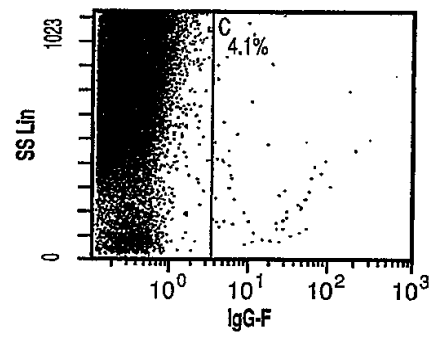
도면32n



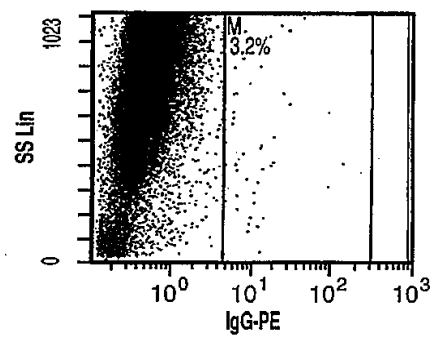
도면32o



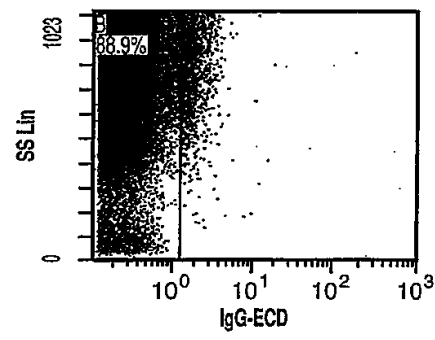
도면32p



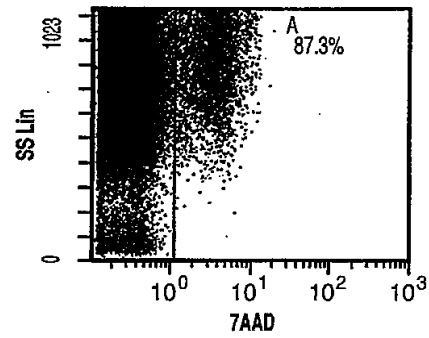
도면32q



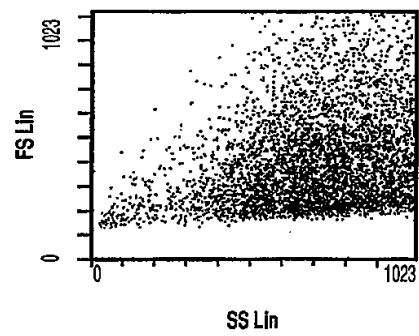
도면32r



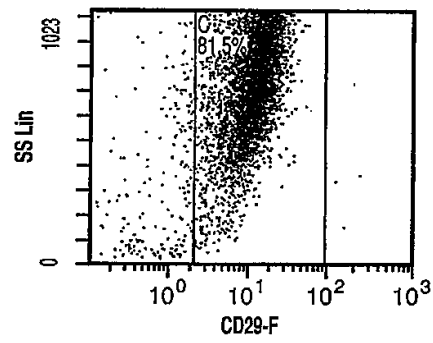
도면32s



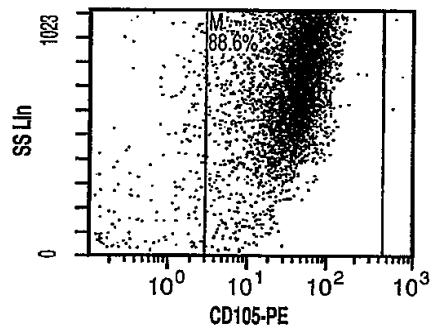
도면32t



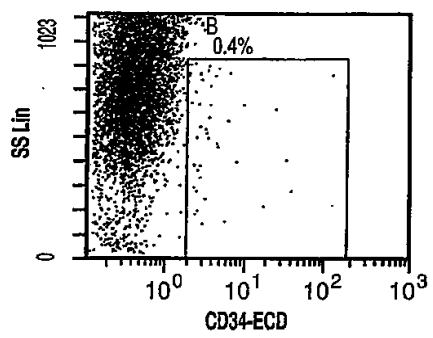
도면32u



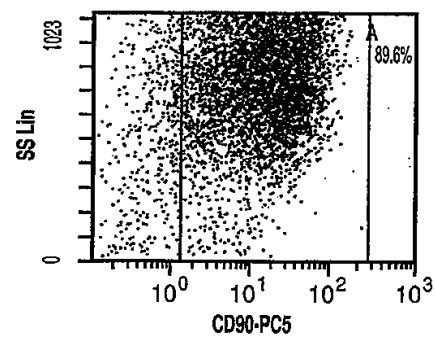
도면32v



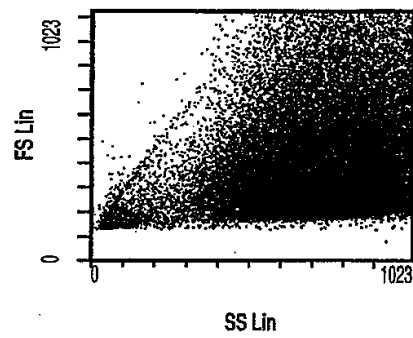
도면32w



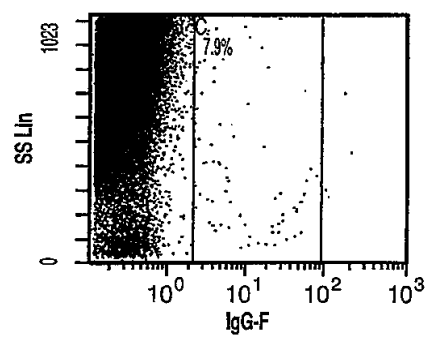
도면32x



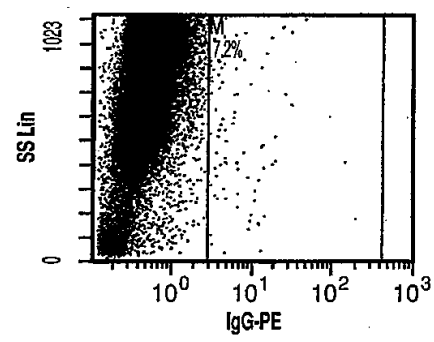
도면32y



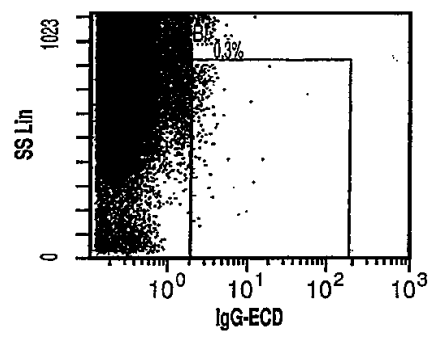
도면32z



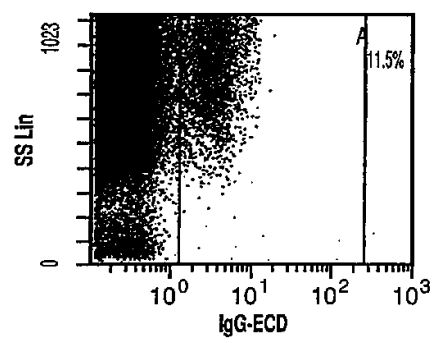
도면32aa



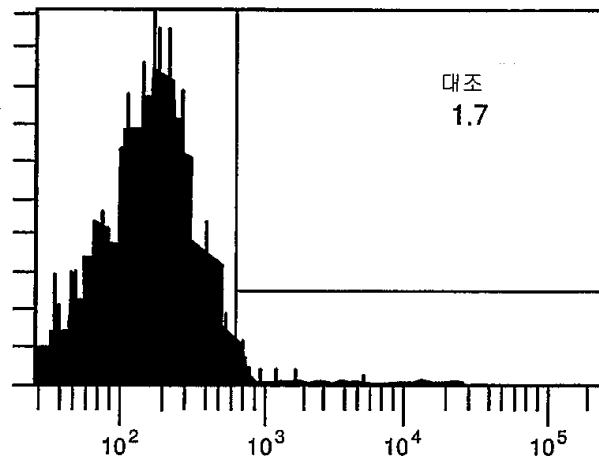
도면32bb



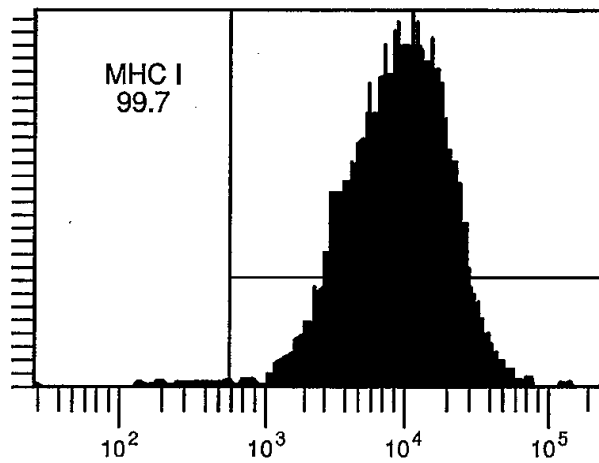
도면32cc



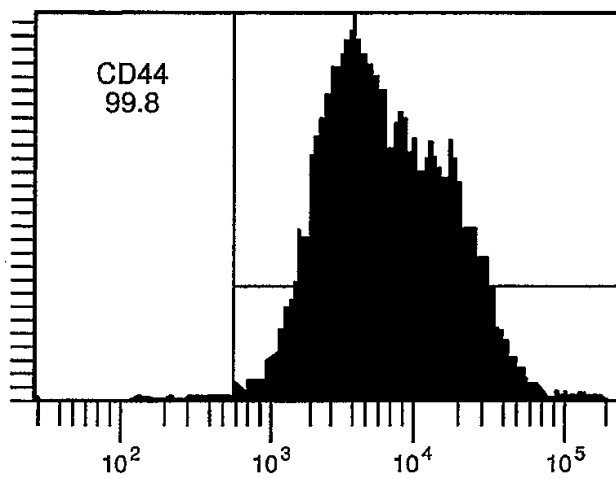
도면33a



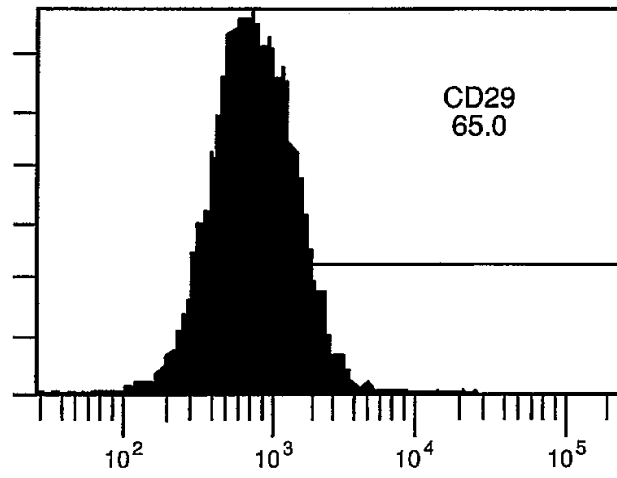
도면33b



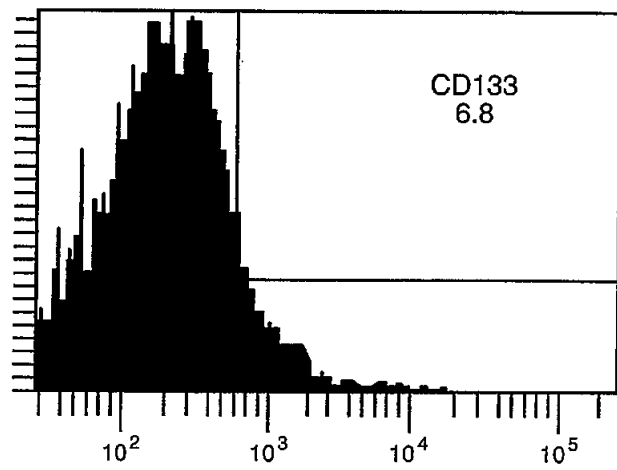
도면33c



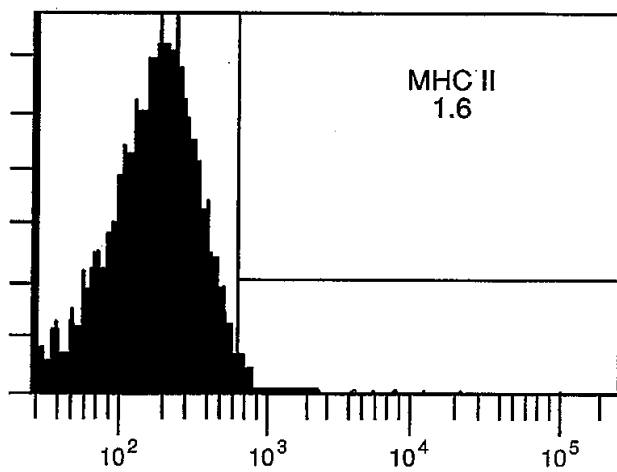
도면33d



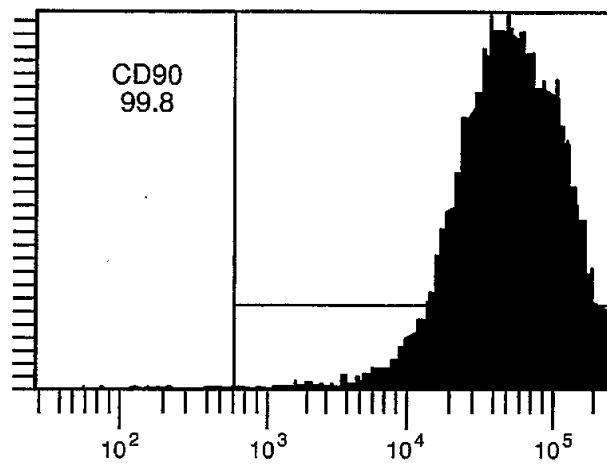
도면33e



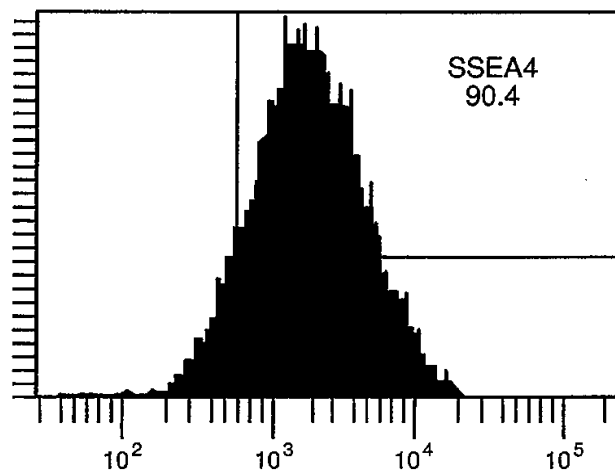
도면33f



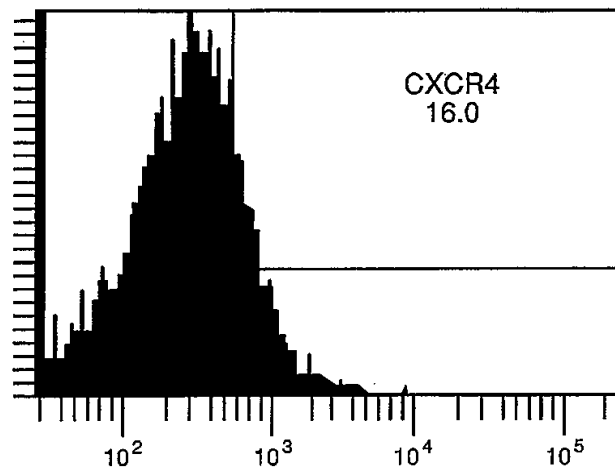
도면33g



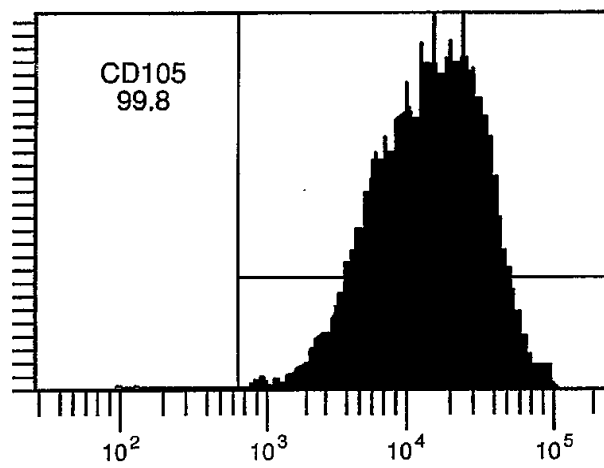
도면33h



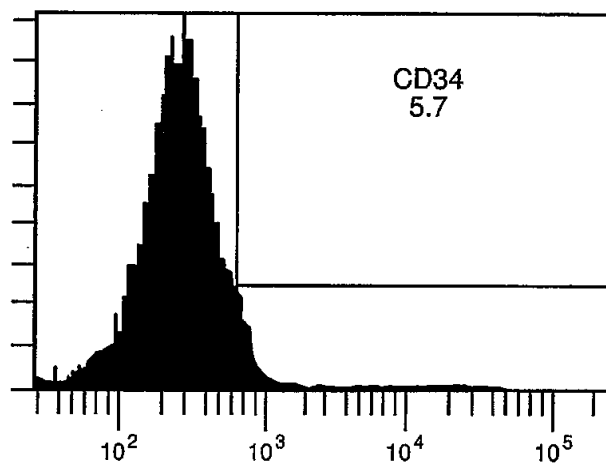
도면33i



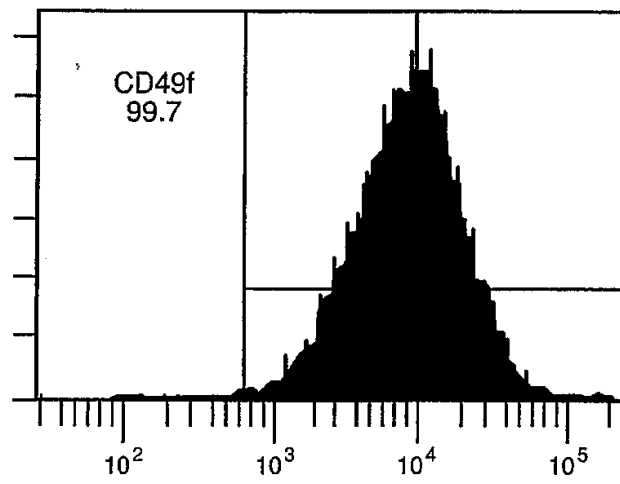
도면33j



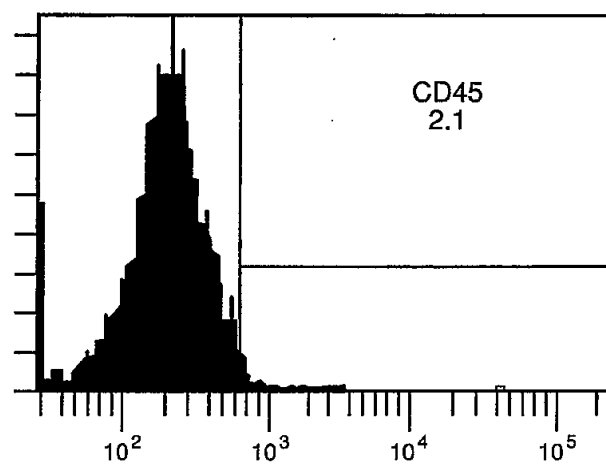
도면33k



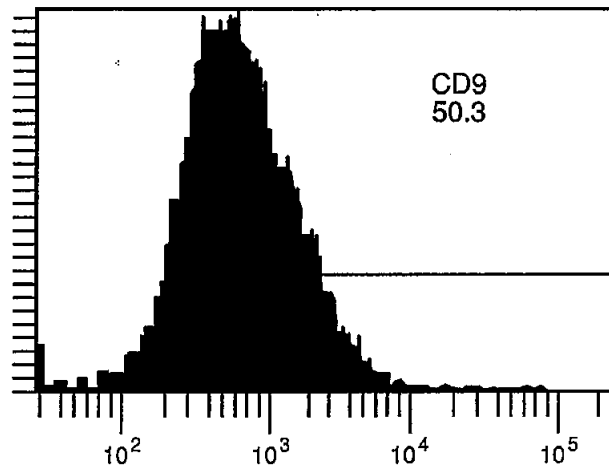
도면33l



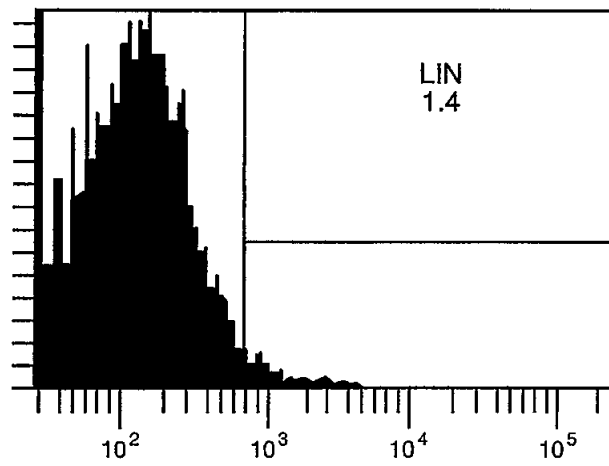
도면33m



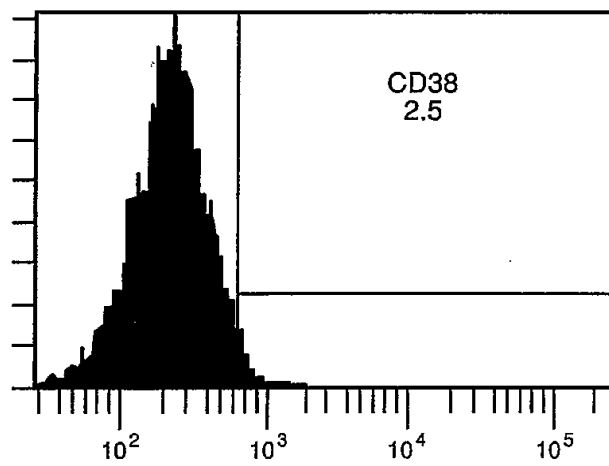
도면33n



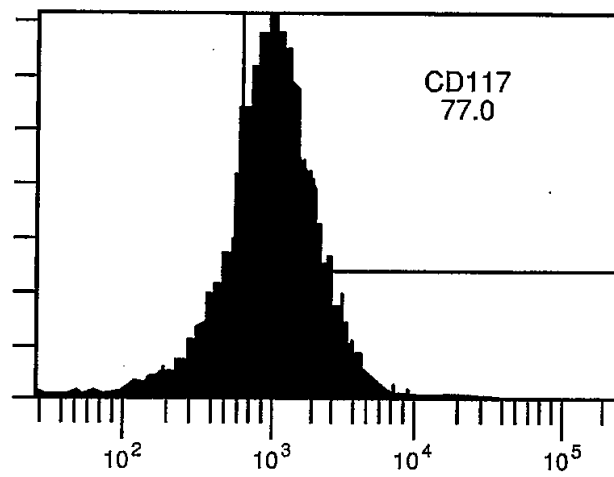
도면33o



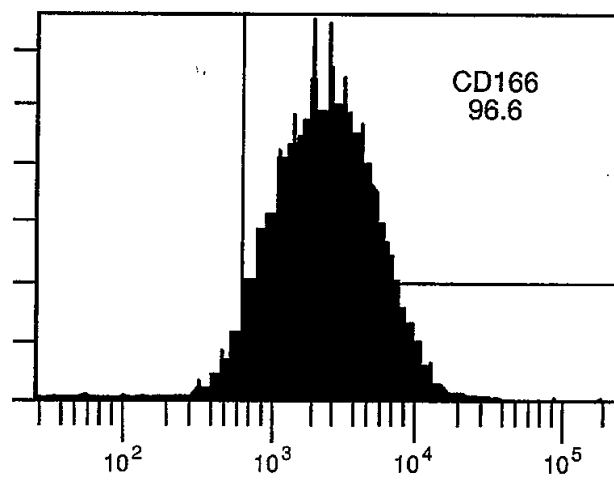
도면33p



도면33q



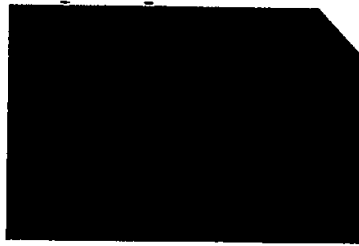
도면33r



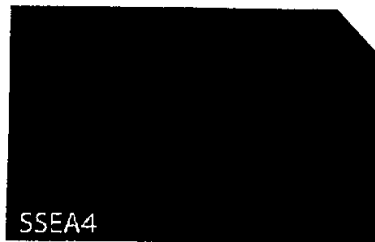
도면34a



도면34b



도면34c



도면34d



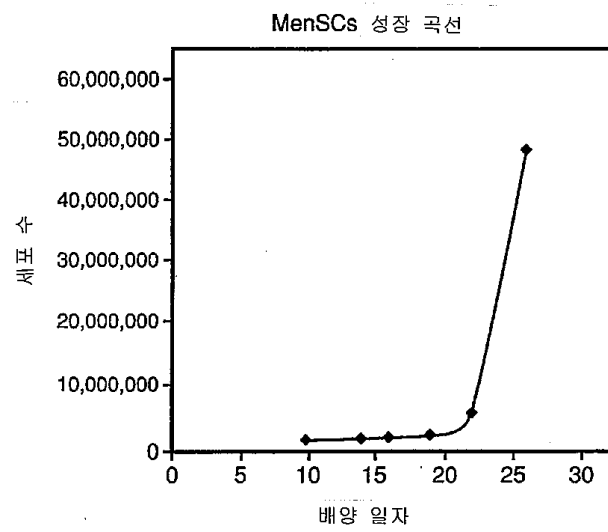
도면34e



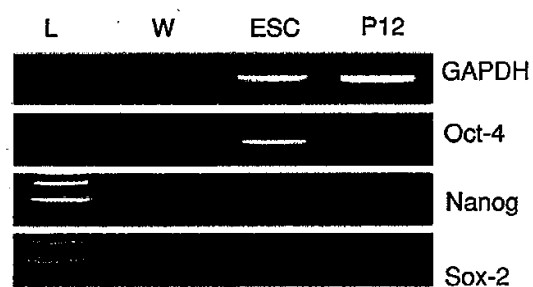
도면34f



도면35a



도면35b



도면36a



도면36b



도면36c



도면36d



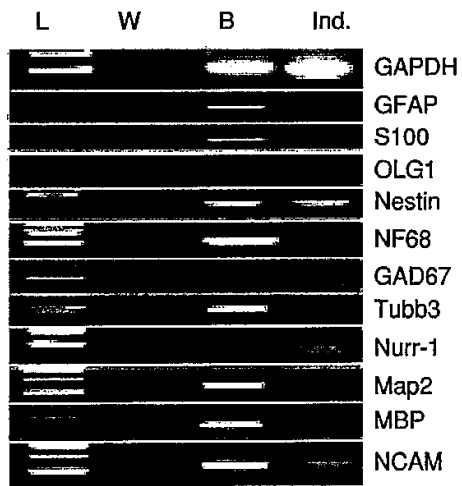
도면36e



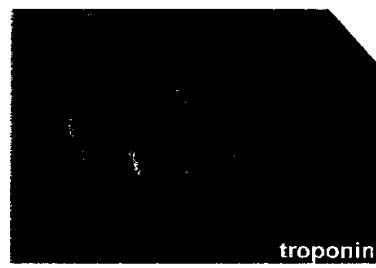
도면36f



도면36g



도면37a



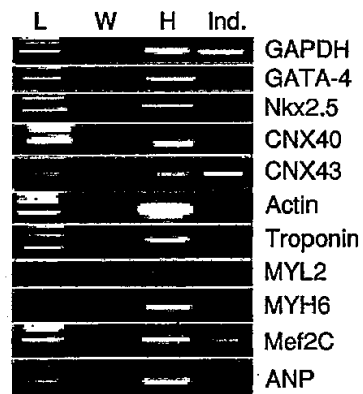
도면37b



도면37c



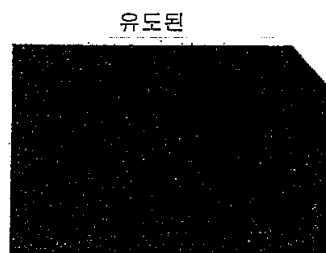
도면37d



도면38a



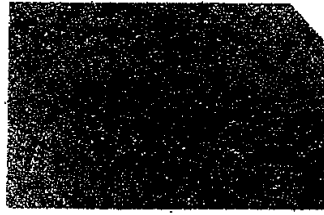
도면38b



도면38c



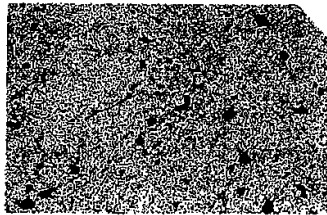
도면38d



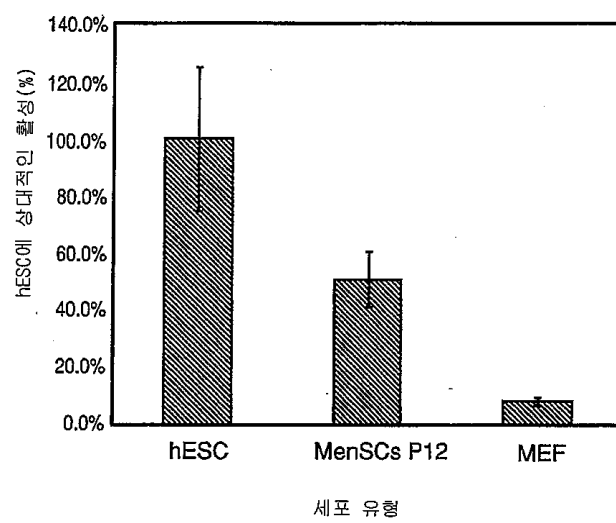
도면38e



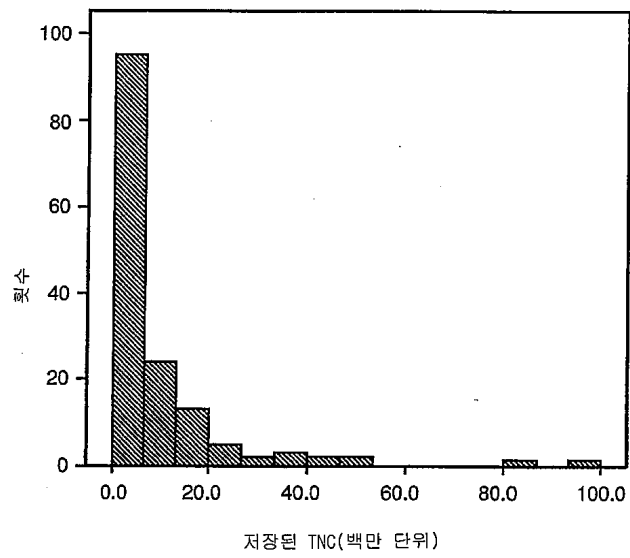
도면38f



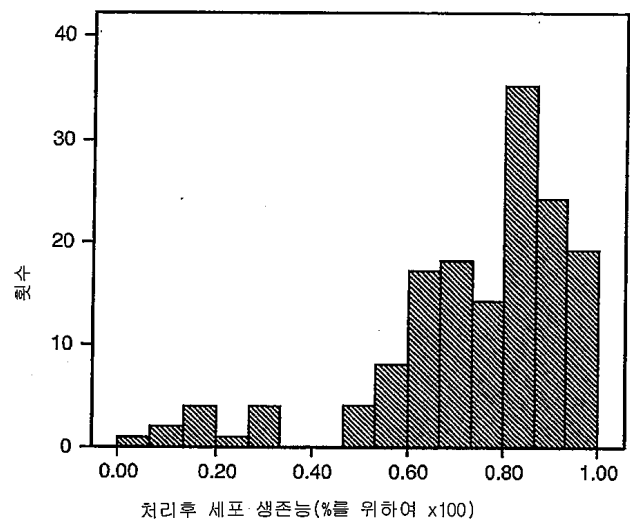
도면39



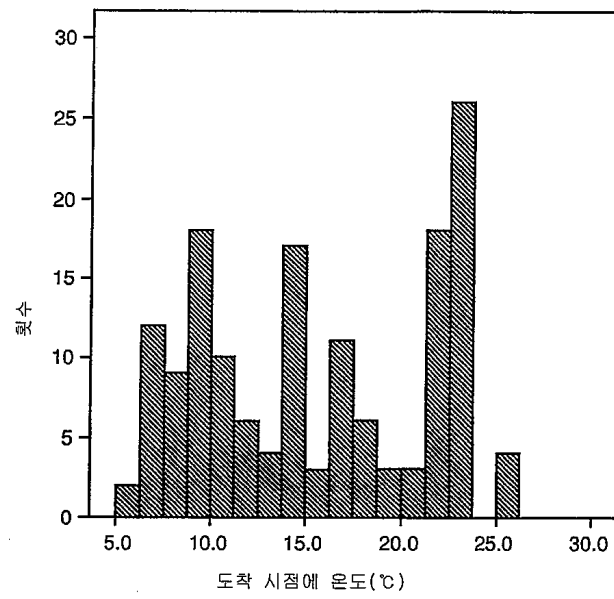
도면40



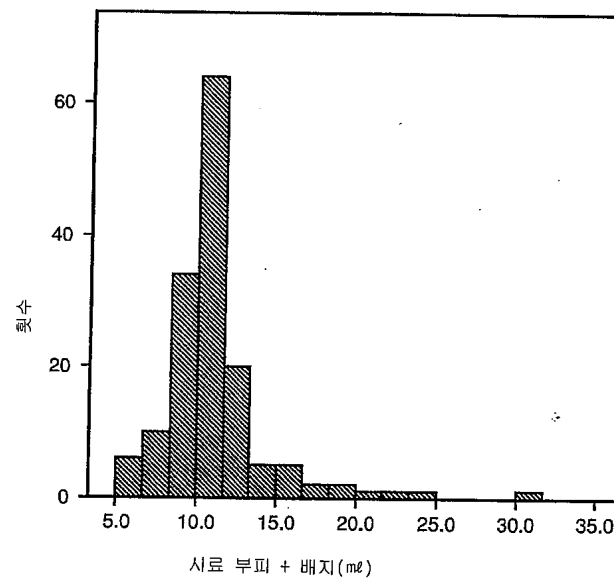
도면41



도면42



도면43



도면44

