



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2007-0103431  
 (43) 공개일자 2007년10월23일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.<br/>                 C12N 5/06 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)<br/>                 C12N 5/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-7018081<br/>                 (22) 출원일자 2007년08월06일<br/>                 심사청구일자 없음<br/>                 번역문제출일자 2007년08월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2006/002961<br/>                 국제출원일자 2006년01월26일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2006/081435<br/>                 국제공개일자 2006년08월03일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>                 60/647,588 2005년01월27일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>                 리제네텍 인코포레이티드<br/>                 미국 77478 텍사스주 슈가 랜드 크릭포드 씨클 1323</p> <p>(72) 발명자<br/>                 러드 도니<br/>                 미국 텍사스 77478 슈가 랜드 크릭포드 씨클 1323</p> <p>(74) 대리인<br/>                 특허법인 신성</p> |
|--|--|

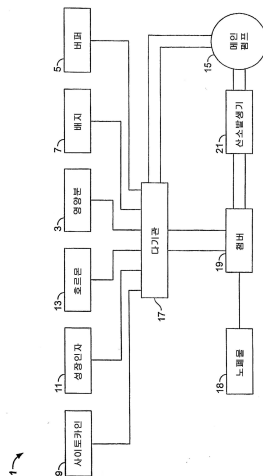
전체 청구항 수 : 총 53 항

**(54) 제대혈로부터 유래한 용이하게 가능한 세포 물질을제공하는 방법 및 그의 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 포유류 제대혈 줄기세포, 바람직하게는 CD34+/CD38- 세포의 TVEMF-증식, 그 TVEMF-증식된 세포로부터 만들어진 조성물, 그 조성물로 질병의 CY 또는 조직 재생의 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물에 대한 다양한 잇점과 효과가 여기에 기재된다.

**대표도** - 도1



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

포유류에서 유래한 제대혈 줄기 세포들,

여기서 상기 제대혈 줄기 세포들은 자연계에서 존재하는 제대혈보다 적어도 7배 이상의 부피 당 수를 가지고;

상기 제대혈 줄기 세포들은 자연계에서 존재하는 제대혈 줄기세포와 필수적으로 동일한 3차원 형태 및 세포-세포 서포트 및 세포-세포 형태를 가짐.

**청구항 2**

제 1항의 제대혈 줄기 세포들 및 수용가능한 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 3**

제 2항에 있어서, 상기 수용가능한 담체는 혈장, 혈액, 알부민, 세포 배양 배지, 성장 인자, 구리 킬레이트제, 호르몬, 버퍼, 및 동결보존제로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 성장 인자는 G-CSF인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 5**

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 그 제대혈 줄기 세포들을 극저온 보존하기에 충분한 온도에 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 6**

제 2항에 있어서, 상기 동결보존제는 상기 세포들을 냉동보존하는데 충분한 양 존재하고 그 조성물은 약 -120℃에서 약 -196℃ 온도에서 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 7**

제 6항에 있어서, 상기 온도는 약 -130℃에서 약 -150℃의 온도인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 8**

제 6항에 있어서 상기 조성물은 약학적으로 수용 가능한 담체를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 9**

제3항에 있어서, 상기 조성물은 60에서 80% 아미노산-포도당 용액 하의 20에서 40% 디메틸 설펝사이드; 15에서 25% 하이드록시에틸 녹말 용액; 6에서 10% 텍스트란 T10, 3에서 5% 포도당; 4에서 6% 글리세롤; 15에서 25% 폴리에틸렌 글리콜; 및 75에서 85% 아미노산-포도당 용액으로 구성된 군으로부터 선택된 한 동결보존제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 10**

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 독성 물질이 없는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 11**

포유류로부터 유래한 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들의 부피당 수는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들이 유래한 제대혈의 부피 당 줄기 세포 수보다 적어도 2배 이상인 것을 특징으로 하는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들.

**청구항 13**

제 12항에 있어서, 상기 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들의 부피당 수는 적어도 7배 이상인 것을 특징으로 하는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들.

**청구항 14**

제 13항의 제대혈 줄기 세포들 및 수용가능한 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 15**

제13항의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 혈장, 혈액, 알부민, 세포 배양 배지, 성장 인자, 구리 킬레이트제, 호르몬, 버퍼, 및 동결보존제로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 16**

제 15항에 있어서, 상기 성장 인자는 G-CSF인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 17**

제14항에 있어서, 상기 조성물은 60에서 80% 아미노산-포도당 용액 하의 20에서 40% 디메틸 설피록사이드; 15에서 25% 하이드록시에틸 녹말 용액; 6에서 10% 텍스트란 T10, 3에서 5% 포도당; 4에서 6% 글리세롤; 15에서 25% 폴리에틸렌 글리콜; 및 75에서 85% 아미노산-포도당 용액으로 구성된 군으로부터 선택된 한 동결보존제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 18**

제 14항에 있어서, 상기 조성물은 그 제대혈 줄기 세포들을 극저온 보존하기에 충분한 온도에 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 19**

제 14항에 있어서, 상기 동결보존제는 존재하고 그 조성물은 약 -120℃에서 약 -196℃ 온도에서 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 20**

제 14항에 있어서, 상기 온도는 약 -130℃에서 약 -150℃의 온도인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 21**

제 14항에 있어서, 상기 조성물은 독성 물질이 없는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 22**

- a) TVEMF-생물반응장치의 배양 챔버에 제대혈 혼합물을 놓은 단계; 및
- b) 상기 제대혈 혼합물에 TVEMF를 가하고, 제대혈 줄기 세포 조성물을 제조하기 위하여 그 제대혈 줄기세포를 TVEMF-증식시키는 것을 포함하는 제대혈 줄기 세포 조성물의 제조 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 TVEMF는 약 0.05에서 약 6.0 가우스인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 24**

제 22항에 있어서, 상기 TVEMF-증식은 상기 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들의 부피당 수가 TVEMF-생물반응장치에 놓인 제대혈 줄기 세포의 부피 당 수 보다 적어도 7배 이상일 때까지 계속되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 25**

제 22항에 있어서, 상기 방법은 TVEMF-생물반응장치 내에 제대혈 혼합물을 놓기 전에 포유류로부터 제대혈을 수집하는 것을 더욱 포함하는 방법.

**청구항 26**

제 25항에 있어서, 상기 포유류는 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 27**

제22항에 있어서, 상기 제대혈을 제대혈 혼합물에 첨가하기 전에 제대혈 저장 장치로부터 해동된 냉동보존 제대혈을 수집하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 28**

제 22항에 있어서, TVEMF-증식 전에 제대혈 혼합물로부터 독성 물질을 제거하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 29**

제 22항에 있어서, 상기 TVEMF-생물반응장치는 내부 TVEMF 소스를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 30**

제 22항에 있어서, 상기 TVEMF-생물반응장치는 인접한 TVEMF 소스를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 31**

제 22항에 있어서, 상기 제대혈 혼합물은 다른 제대혈 구성요소로부터 분리된 CD34+/CD38- 제대혈 줄기 세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 32**

제 22항에 있어서, 상기 제대혈 혼합물은 다른 제대혈 구성요소로부터 분리된 비피 코트를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 33**

제 22항에 있어서, 상기 제대혈 혼합물은 적혈구가 없는 제대혈을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 34**

제 22항에 있어서, 조절된 속도로 극저온 용기의 온도를 -120℃에서 -196℃ 온도의 온도까지 낮추고, 그 온도를 가지는 극저온 용기로 TVEMF-증식된 제대혈 줄기세포를 전달하는 단계를 더욱 포함하는 방법.

**청구항 35**

제 34항에 있어서, 조절된 속도로 그 온도를 -120℃에서 -196℃ 온도까지 낮추기 전에, 그 제대혈 줄기 세포 조성물로부터 독성물질을 제거하는 단계를 더욱 포함하는 방법.

**청구항 36**

제 34항에 있어서, 그 온도를 낮춘 후에 그 극저온 용기의 온도를 -120℃에서 -196℃ 온도까지 일정 기간 동안 유지하는 단계를 더욱 포함하는 방법.

**청구항 37**

제 36항에 있어서, 상기 일정 기간은 적어도 1년 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 38**

제 36항에 있어서, 상기 온도를 낮추고 유지한 후에 포유류에 상기 제대혈 줄기 세포 조성물을 투여하기에 적합한 온도로 조절된 속도에서 극저온 용기의 온도를 증가시키는 단계를 더욱 포함하는 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 상기 증가된 온도 제대혈 줄기 세포 조성물로부터 독성물질을 제거하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 40**

제34항에 있어서, 상기 제대혈 줄기 세포 조성물의 TVEMF-증식된 세포에 동결보존제를 첨가하는 단계를 더욱 포함하는 방법.

**청구항 41**

제22항에 의한 방법에 의하여 제조된 제대혈 줄기 세포들 및 수용가능한 담체를 포함하는 조성물.

**청구항 42**

제 1항의 제대혈 줄기 세포들 및 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 조성물을 치료적으로 유효한 양 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 포유류 조직 재생(repair)방법.

**청구항 43**

제 11항의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들 및 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 조성물을 치료적으로 유효한 양 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 포유류 조직 재생(repair)방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 상기 재생되는 조직은 인간 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 45**

제43항에 있어서, 상기 재생되는 조직은 생명유지에 필수적인 기관인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 46**

제 44항에 있어서, 상기 재생되는 조직은 간 조직, 심장 조직, 조혈 조직, 혈관, 피부 조직, 근육 조직, 장 조직, 췌장 조직, 중추신경계 세포, 뼈, 연골 조직, 결합 조직, 폐 조직, 비장 조직, 및 뇌 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 47**

제43항에 있어서, 상기 포유류에 투여되는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포의 양은 적어도 ml당  $10^7$ 에서  $10^9$  줄기 세포들을 가지는 적어도 20 ml의 조성물인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 48**

제 1항의 제대혈 줄기 세포들 및 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 조성물을 치료적으로 유효한 양 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 포유류의 질병을 치료하는 방법.

**청구항 49**

제 11항의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들 및 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 조성물을 치료적으로 유효한 양 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 포유류의 질병을 치료하는 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 재생되는 조직은 인간 조직인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 상기 재생되는 조직은 생명유지에 필수적인 기관인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 52**

제 50항에 있어서, 상기 재생되는 조직은 간 조직, 심장 조직, 조혈 조직, 혈관, 피부 조직, 근육 조직, 장 조직, 췌장 조직, 중추신경계 세포, 뼈, 연골 조직, 결합 조직, 폐 조직, 비장 조직, 및 뇌 조직으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 53**

제49항에 있어서, 상기 포유류에 투여되는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포의 양은 적어도 ml당  $10^7$ 에서  $10^9$  줄기 세포들을 가지는 적어도 20 ml의 조성물인 것을 특징으로 하는 방법.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 TVEMF-생물반응장치(bioreactor)에서 제조된 제대혈 유래 성체 줄기 세포와 그 제조방법 그것의 조성물 및 그 세포 또는 조성물로 포유류를 치료하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

<2> 인간의 조직의 재생은 의학분야의 오래된 소망이었다. 현재까지 인간 조직의 재생은 공여자로부터 조직과 같은 이식에 의하여 주로 달성되었다. 헤릭(Herrick) 쌍둥이들 중 하나로부터 다른 이에게 신장 이식과 후에 세계적으로 유명해진 1967년 12월 3일 데니스 다르발(Darval)로부터 루이스 와스칸스키(Washkansky)에게 심장을 이식한 남 아프리카 의사 크리스찬 바르나드로 시작하여 조직 이식은 최종 환자에게 생명을 연장시키는 방법으로 광범위하게 수용되어졌다.

<3> 그것의 최초 사용으로부터 인간 조직의 이식은 인체의 천연 면역 시스템에 기인한 주로 조직 거부와 같은 주요한 문제에 봉착되었다. 이것은 종종 조직 이식의 사용이 제한된 기간의 생명 연장을 야기하였다(와스칸스키는 단지 수술 후 18일만 생존하였다).

<4> 인체 면역 시스템의 문제를 극복하기 위하여 많은 항-거부 약들(예를 들어, 르무란(Imuran), 사이크로스포린(Cyclosporine))은 면역 시스템을 억제하고 거부하기 전에 조직의 사용을 증대시키기 위하여 곧 개발되었다. 그러나 거부 문제점은 조직 이식에 대한 대안의 필요성이 계속되었다.

<5> 골수 이식 또한 사용되었고 백혈병과 같은 일부 질병의 치료를 위하여 골수와 같은 조직을 재생하는 것이 선택의 과정이나 골수 이식 또한 문제점을 가진다. 그것은 공여자로부터 매치를 필요로 한다(50%의 이하에서 발견); 그것은 고통스럽고 비싸고 위험하다. 결론적으로 골수 이식의 대안은 매우 바람직하다. 미국 특허 제 6,129,911에서 발견된 간 줄기 세포의 이식과 같은 조직 줄기 세포들의 이식은 그들의 광범위한 사용을 의심스럽게하는 유사한 제한들을 가진다. 최근 몇 년에, 연구자들은 조직 이식체의 대안으로 전분화능 배아 줄기 세포의 사용을 실험해 왔다. 배아 줄기 세포의 사용 뒤의 이론은 그들이 인체 내 조직을 실질적으로 재생하는데 이론적으로 이용될 수 있다는 것이다. 그러나 조직 재생에 배아 줄기 세포들의 이용 역시 문제점에 봉착한다. 이들 더 심각한 문제점들은 이식된 배아 줄기 세포들이 제한된 조절가능성(controllability)을 가지고, 그들은 종종 종양으로 성장하며, 연구에 이용되는 인간 배아 줄기 세포들은 환자들의 면역 시스템에 의하여 거부될 수 있다는 것이다 (Nature, June 17, 2002: Pearson, "줄기 세포 Hopes Double", news@nature.com, published online:21 June 2002). 또한 배아 줄기 세포들의 광범위한 사용은 윤리적, 도덕적 정치적인 문제점을 매우 많이 가지고 있어서 그들의 광범위한 사용이 의심점으로 남는다.

<6> 제대혈은 여러 분야들의 연구의 초점이었다. 줄기 세포들의 다분화능은 골수에서 발견된 성체 줄기 세포로부터 처음 발견되었다. Verfaillie, CM. 등, 성인 골수에서 유래한 중간엽 줄기세포의 다분화능. Nature 417, published online 20 June; doi:10.1038/nature00900, (2002) cited by Pearson, H. 줄기 세포 hopes double, news@nature.com, published online:21 June 2002; doi: 10.1038/news020617-11. 다분화 CD34+ 줄기 세포들 및 소분화(oligopotent) 림프 전구 세포들은 제대혈에서 발견되고 림프 자연 킬러 세포와 같은 세포타입으로 분화되어지는 것을 보인다. Perez S.A. et al., A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical 제대혈. Blood 101(9):3444-50 (May 1, 2003). 또 B 세포 전구체들은 골수뿐 아니라 제대혈에서도 존재하는 것이 발견되었다. Sanz E. et al., Human 제대혈 CD34+Pax-5+ B-cell progenitors: single-cell analyses of

their gene expression profiles. Blood 101(9):4324-30 (May 1, 2003).

- <7> Boyse 등, U.S. Pat. No. 6,569,427 B1은 빈혈, 암, 자가면역 질환들 및 여러 면역 이상 및 결핍과 같은 여러 질병들 및 이상의 예방 또는 치료에 냉동보관된(cryopreserved) 태아 또는 신생아 혈의 유용성 및 그 냉동보관을 기재한다. Boyse는 또한 유전자 치료에서 조혈 복원(reconstitution)의 사용으로 이종(heterologous) 유전자 서열의 사용을 기재한다. 그러나 Boyse의 기제는 치료 용도를 위하여 세포들의 증식을 정지하였다. 제대혈 은행, CorCell는 제대혈 줄기 세포들의 이식, 냉동보관 및 증식에 대한 통계를 제공한다. "제대혈 줄기 세포들의 확장", 정보 시트(Sheet) 제대혈, CorCell, Inc. (2003). 한 증식 과정은 중앙 콜라겐 기초 기질로 생물반응장치를 이용하는 것을 기재한다. Research Center Julich: Blood Stem Cells from the Bioreactor. 2001년 5월 17일 발행. 또 증식 전 후에 제대혈의 냉동은 줄기 세포들의 증식 능력에 영향이 없다는 것을 보였다. Lazzari, L. et al., Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. Bone Marrow Trans. 28:693- 698(2001).
- <8> 제대혈은 골수와 비교하여 조혈 저장소의 더 나은 복원을 제공하는 것이 알려졌다. Frassoni F. et al., cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir as compared to bone marrow transplantation. Blood (April 3, 2003). 또한 First Unrelated stem cell Transplant Performed in Atlanta December 12, 1998- 1 year update. Bone Marrow and 제대혈 줄기 세포 Transplant, The Sickle Cell Information Center (1999)를 참조. 연구는 줄기 세포들의 증식에 관여된 분자적 기작을 밝히는데 노력을 계속하였다. 예를 들어 그 CorCell 논문은 제대혈 줄기 세포들의 발생을 Delta-1이라 명명된 신호 분자가 돕는다는 것이 개재되었다. Ohishi K. 등: Delta-1이 인간 CD34+/CD38- 제대혈 세포들의 골수 및 흉선 재생(repopulating)능을 증가시킴. Clin. Invest. 110:1165-1174 (2002).
- <9> 본 출원에서 "제대혈 세포"란 용어는 태아 또는 신생아의 태반 및/또는 탯줄(umbilical cord)로부터 유래한 혈구 세포를 의미한다.
- <10> 비록 제대혈 세포들은 성체 또는 체세포 줄기 세포로 정의하지만, 몇 가지 요소들이 제대혈 세포 및 특히 제대혈 줄기 세포들을 독특하게 만든다
- <11> 첫째, 제대혈은 발생의 초기(primitive)이다. 제대혈 줄기 세포들은 어리다; 그들은 늙은 세포들보다 더 유연성을 가지고, 그것은 더 다양한 특정 세포들을 초래한다는 것을 의미한다. 그들은 또한 DNA 변화시킬 수 있는 해로운 환경 독소들에 의한 영향을 받을 더 적은 기회를 가지기 때문에 더 건강한 세포일 수 있다. 게다가 그들은 젊기 때문에, 제대혈 줄기 세포들은 수용환자들에게 더 잘 융합될 수 있고, 세포 거부 또는 이식편 대 숙주병(graft vs. host disease;GvHD)을 덜 야기할 것이다. 또한 그들은 젊기 때문에, 제대혈 줄기 세포들은 예를 들어 제대혈 줄기 세포들이 상대적으로 새롭고 더 보호된 환경에 있기 때문에 성년 말초 혈액 줄기세포들보다 더 안정하다고 여겨질 수 있다. 따라서 제대혈 줄기 세포들은 예를 들어 더 성숙된 줄기세포들보다 예를 들어 냉동보관에 의한 손상에 더 예민할 수 있다.
- <12> 두 번째 제대혈은 줄기세포가 풍부하다. 제대혈은 백혈구(단핵세포를 포함; 본 발명을 위하여 단핵 세포는 단지 하나의 핵만을 가진 세포임)와 적혈구를 포함한다. 전형적으로, 약 1 -2%의 제대혈 단핵세포들이 줄기세포이다. 이것은 제대혈을 줄기 세포의 가장 풍부한 공급원 중 하나로 만든다.제왕절개로부터 수집한 제대혈은 전형적으로 자연분만 후에 즉시 수집한 제대혈에 비하여 약간 더 줄기세포가 풍부하다. 다른 조직들과 반대로 제대혈에서 줄기세포를 수집하는 것은 더 용이하다. 성체 줄기세포는 많은 성숙 조직에서 발견될 수 있지만, 그들은 더 적은양 발견되고 발견하기가 더 어렵다.
- <13> 세 번째 그리고 마지막으로 제대혈은 줄기세포의 용이한 공급원이다. 골수와 같은 인체 조직으로부터 이식한 성체 줄기 세포는 쉽게 이용하지 못한다. 제대혈 은행은 용이하게 이용할 수 있는 줄기 세포의 공급원을 제공한다. 출생 직후 전형적인 인간 신생아로부터 제대혈 수집은 전형적으로 50에서 100 ml 제대혈을 낸다.
- <14> 제대혈은 포함하는 탯줄은 영양분을 제공하고 노폐물을 제거하는 태아를 엄마 태반과 연결하는 코드이다. 그 탯줄은 태아의 복부 벽으로부터 엄마의 태반으로 연결된 약 22 in. (56 cm) 길이의 코드 유사 구조이다. 탯줄의 주된 기능은 태반으로부터 태아로 산소와 영양분을 운반하고 태아로부터 태반으로 노폐물을 회수하는 것이다. 필수적으로, 그 탯줄은 한 말단에 태아 막을 다른 말단은 태반에 연결되어 형성된 코드 유사 구조이다. 그 코드 내에 태아로부터 탈산소화된 혈액을 운반하는 두 동맥과 태아에게 산소화된 혈액을 운반하는 하나의 정맥을 가지는 무코이드 젤리를 포함한다.
- <15> 혈액은 탯줄을 따라서 태아로부터 태반으로 운반된다. 인 비보 태반에서, 엄마의 혈액으로부터 산소, 영양분 및

항체들이 제대혈로 확산되어서 엄마의 혈액과 매우 근접하게 제대혈을 나오게 한다. 태아로부터 노폐물은 엄마 혈액으로 두 탈산소화된 동맥을 통하여 통과된다. 그 후 노폐물이 없고 산소화되고 영양분이 풍부한 제대혈은 탯줄을 통하여 산소화된 혈액을 운반하는 정맥에 의하여 태아로 다시 운반된다.

- <16> 출생 후 탯줄은 압박되어 절단된다. 그 코드가 절단된 후 붙어 있는 잘린 부분은 종종 시들어 떨어지고 배꼽이라는 스카를 남긴다. 제대혈에 줄기 세포들이 특히 풍부하기 때문에 일부 부모들은 특정한 제대혈 은행에 그것을 보관하는 것을 선택한다. 그 제대혈 줄기 세포들은 골수의 대안으로 이식체로 후에 필요한 경우에 사용될 수 있다. 연구들은 심지어 제대혈 공여체와 관련없는 사람들도(유전적으로 미스매치된) 제대혈 세포를 거부하는 면역 반응을 야기하지 아니하고 백혈병 및 다른 암들과 싸우는데 제대혈의 이식체로부터 이득을 얻을 수 있다는 것을 보인다.
- <17> 제대혈을 수집하는 두 전형적인 방법; 혈액 백 수집과 주사기 수집이 있다. 혈액 백 수집은 의료진이 제대 정맥에 바늘을 삽입하여 중력의 도움으로 혈액으로부터 백으로 뽑아내는 것이 관여한다. 일단 혈액이 흐름을 멈추면 그 백은 밀봉되고 의료진에 의하여 레이블된다. 이 방법은 태반이 분만되기 전에 일반적으로 행해진다.
- <18> 주사기 수집은 항응고제(혈액을 응고로부터 방해하는 물질)를 포함하는 주사기에 제대혈을 넣는 것을 제외하고는 혈액 백 수집과 유사하다. 그 혈액은 혈액 백 대신에 주사기들에 저장된다. 이 방법은 태반이 분만되기 전 후에 행해질 수 있다. 혈액 백 수집보다 혈액을 수집하는 더 신뢰할 수 있는 방법으로 생각된다. 그것은 또 혈액 백 수집으로 가능한 것보다 더 많은 혈액을 수집하게 한다. 어떠한 방법을 이용하든지 또는 제대혈을 수집하는데 또 다른 방법을 이용하든지, 수집의 전체 과정은 수행하는데 5분 또는 그 이하가 소요될 수 있다. 바람직하게는, 그 제대혈은 출생 후 10에서 15분 이내에 수집된다. 이것보다 더 오래 기다리면 더 적은 양의 제대혈의 수집을 야기하고 따라서 더 적은 양의 제대혈 줄기 세포들이 수집된다.
- <19> 제대혈 은행 또는 저장의 경우에, 일단 제대혈이 저장소에 도착하면 그 제대혈은 간염, HIV/ AIDS, 백혈병 또는 면역 이상과 같은 전염성 또는 유전성 질환을 운반하는지를 확인하기 위하여 테스트된다. 만약 그 제대혈에 그와 같은 문제점이 있다면, 그것은 저장 부적합으로 간주되거나 일부 경우에 그 혈액은 관련된 위험을 기제하여서 저장될 수도 있다. 만약 미래에 그 혈액이 필요하다면 부모들은 제대혈 줄기 세포들에 대한 필요성이 그 제대혈과 관련되어 운반된 그 관련 위험성보다 더 큰지 어떠한지를 평가할 수 있다.
- <20> 저장될 제대혈은 저장되기 전에 일련의 과정을 통하여 진행된다. 먼저, 그 제대혈은 그것의 구성요소들; 백혈구, 적혈구 및 혈장으로 분리된다. 이것은 원심분리(그 혈액이 분리될 때까지 혈액의 용기를 회전하는 장치) 또는 침전(혈액의 분리를 야기하게 혈액 용기 내로 침전제를 투여하는 과정)으로 수행된다. 2차, 일단 제대혈이 바닥에 적혈구(RBC), 중간에 백혈구(WBC), 맨 위에 혈장으로 분리되면, 그 백혈구는 저장을 위하여 제거된다. "버피 코트"로 알려진 중간층은 문제의 제대혈 줄기 세포를 포함하고 혈액의 다른 부분들은 필요하지 아니하다. 일부 은행에서 이것은 일부의 그들의 가공이 있을 것이다. 그러나 다른 은행에서는 백혈구로부터 단핵 세포들(이 경우, 백혈구의 서브셋)을 제거하기 위하여 버피 코트 가공을 계속할 것이다. 이 방법을 모든 이가 동의하지는 아니하지만, 덜 저장되고 그 세포를 저장하는데 액체 질소가 덜 필요하다.
- <21> 제대혈 샘플로부터 적혈구를 제거하는 것이 바람직하다. 사람들은 동일한 HLA 타입 (줄기 세포들의 이식에 필요한 것)은 가질 수 있지만, 그들은 동일한 혈액형을 가지지 않을 수 있다. 적혈구를 제거하여 줄기 세포 이식의 역반응을 최소화할 수 있다. 따라서 적혈구를 제거하여, 그 줄기 세포 샘플은 더 많은 사람들에게 양립할 수 있는 기회를 가진다. 적혈구는 해동 시에 터져서 자유 헤모글로빈을 누출할 수 있다. 이 타입의 헤모글로빈은 이식을 받은 사람들의 신장에 심각한 영향을 줄 수 있다. 또 줄기 세포들의 생존가능성은 적혈구 파열 시에 감소된다.
- <22> 세포를 냉동하기 전에 그들은 증식될 수 있다(즉, 크기가 아니라 수의 증가). 일단 적혈구들이 제거되면 그 세포들은 보존되고 장기간 냉동될 것이다. 그러나 이것은 줄기 세포들에 손상을 주지 않기 위하여 천천히 그리고 주의 깊게 진행되어야 한다. 혈액 세포들을 냉동하기 전에 그들은 먼저 냉동시에 손상으로부터 그들을 보호하는 것을 보조하는 용액에 혼합된다. 이 용액을 냉동보존제, 냉동보존 용매 또는 동결방지제라고 명명한다. 일단 증식된 세포들이 냉동보존제에 있으면, 그들은 손상으로부터 세포를 보호하기 위하여 서서히 냉동된다. 일단 냉동(일반적으로 약 -196도의 온도)이 되면, 그 세포들은 장기간 저장 냉동고로 운반된다. 이 냉동고에서 그들은 액체 또는 기체 질소에 냉동을 유지한다. 여러 타입의 냉동고가 제대혈 줄기 세포들을 보존하기 위하여 일반적으로 사용된다. 하나의 타입은 "BioArchive" 냉동고이다. 이 기계는 혈액을 냉동할 뿐 아니라 그 목록을 만들어서 3,626 혈액 백까지 다룬다. 그것은 필요시에 특정 혈액 샘플을 회수할 로보트 팔을 가진다. 이것은 다른 샘플들이 분배되거나 높은 온도에 노출되지 않게 한다. 현재 상업적으로 이용가능한 다른 타입들은 산요 모델

MDF-1155 ATN-152C 및 모델 MDF-2136 ATN-135C, 및 프린스턴 CryoTech TEC 2000을 포함하나 이에 한정되지 아니한다.

- <23> 제대혈 줄기 세포들의 증식은 수일이 소요될 수 있다. 생과 사의 상황 또는 외상 상해의 경우와 같이 제대혈 줄기 세포들의 즉시 공급이 중요한 상황에서 특히 만약 그 세포들을 재투여하기 전에 연구가 필요되어야 한다면 제대혈 줄기 세포들의 증식을 기다리는 며칠은 가능하지 않을 수 있다. 따라서 치료를 연기하는 때문이 생과 사의 차이를 의미하는 긴급상황을 예상하여 출생으로부터 이용가능한 증식된 제대혈 줄기 세포들을 가지는 것이 특히 바람직하다.
- <24> 따라서 기관 이식, 골수 이식 또는 배아 줄기 세포들에 기초하지 아니한 인간 조직의 재생의 과정과 방법을 제공할 필요성이 있고, 수일보다 수시간의 문제에서 사용을 위한 바람직하게는 면역반응을 유도하지 않는 치료 조건이나 용량으로 증식된 제대혈 줄기 세포들의 조성물을 제공할 필요성이 있다.

**발명의 상세한 설명**

- <25> 발명의 요약
- <26> 본 발명은 부분적으로 포유류, 바람직하게는 인간으로부터 유래한 제대혈 줄기 세포들, 바람직하게는 상기 줄기 세포들은 TVEMF-증식된 것에 관한 것이다. 본 발명은 포유류, 바람직하게는 인간으로부터 유래한 제대혈 줄기 세포들, 여기서 상기 줄기 세포들은 자연에서 일어나는 제대혈보다 적어도 7배 큰 부피 당 수이고; 여기서 제대혈 줄기 세포들은 자연에서 발생한(즉 소스) 제대혈의 줄기세포와 동일하거나 필수적으로 동일한 세포-대-세포 기하 및 세포-대-세포 지지체 및 3차원 기하를 가진다. 그러한 세포들은 여기에 기재된 TVEMF-증식 과정에 의하여 바람직하게 만들어진다. 본 발명은 또한 이 세포들과 바람직하게 첨가되는 약학적으로 수용가능한 담체, 냉동보존제 및 세포 배양 배지를 포함하는 다른 구성요소들을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- <27> 본 발명은 또한 TVEMF- 생물반응장치의 배양 챔버에 제대혈 혼합물을 위치하고; 그 혼합물을 TVEMF 생물반응장치에서 TVEMF 및 TVEMF-증식되는 제대혈 줄기세포들에 처리하여 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들과 줄기세포 조성물을 제조하는 줄기 세포 및 줄기 세포 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 그 세포들에 적용된 TVEMF는 약 0.05에서 약 6.0 가우스이다.
- <28> 본 발명은 또한 본 발명의 제대혈 줄기 세포들 및 줄기 세포 조성물들로 포유류를 치료하는 방법에 관한 것이다. 그러한 치료는 질병을 치료하는 조직 치료 및 재생일 수 있고 또는 본 출원에서 논의된 다른 용도들일 수 있다. 또한 본 발명의 제대혈 줄기세포를 포함하는 어느 조직 또는 기관의 재생 또는 여기에서 한정된 이들 질병들의 치료를 위한 조성물 및 방법들을 여기에 포함한다. 또한 여기에는 여기에 기재된 것과 같은 조직의 재생 또는 치료를 위하여거나 또는 여기에 기재된 질병들 중 하나의 치료를 위한 의약품의 제조를 위하여 본 발명의 조성물을 사용하는 것을 포함한다.
- <29> 도면의 상세한 설명
- <30> 가장 단순한 용어에서, 회전 TVEMF-생물반응장치는 시변 전자기력 공급원과 세포 배양 챔버를 포함한다. 조작에서, 제대혈 혼합물이 세포 배양 챔버내로 위치한다. 그 세포배양 챔버는 시변 전자기력 공급원에 의하여 챔버내에 생성된 시변 전자기력의 기간 동안에 회전한다. 시간이 완료되면, 그 증식된 제대혈 혼합물은 챔버로부터 제거된다. 더 복잡한 TVEMF-생물반응장치 시스템에서, 시변 전자기력 공급원은 도 2-5에 기재된 것과 같이 TVEMF-생물반응장치에 통합될 수 있으나, 도 6-8에 나타난 것과 같이 생물반응장치에 인접할 수도 있다. 또한, 세포에 물질을 제공하는 용액 캐리어는 주기적으로 재공급되거나 제거될 수 있다. 바람직한 TVEMF-생물반응장치들을 여기에 기재한다.
- <31> 도 1은 세포 배양 챔버 19, 바람직하게는 회전 세포배양챔버, 산소발생기 21, 바람직하게는 메인 펌프 15의 사용에 의하여 배양 캐리어의 지향성 흐름을 가능하게 하는 장치 및 영양분 3, 버퍼 5, 신선한 배지 7, 사이토카인 9, 메인 펌프 15, 성장인자 11, 호르몬 13을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 세포 캐리어 요소의 선택적 입력을 위한 공급 다기관(manifold) 17을 가지는 포유류 세포를 성장시키는 전체 생물반응장치 배양 시스템에서 배양 캐리어 흐름 루프 1의 바람직한 실시예를 묘사한다. 이 바람직한 실시예에서, 메인 펌프 15는 산소발생기 21로 신선한 용액 캐리어를 제공하고, 거기서 용액 캐리어는 산소화되고 세포 배양 챔버 19를 통하여 통과된다. 세포 배양 챔버 19로부터 사용된 용액 캐리어 내의 노폐물은 제거되어서 노폐물 18로 운반되고 나머지 세포 배양 캐리어는 다기관 17로 돌아가서 필요한 경우에 재순환되기 전에 산소발생기 21을 통하여 세포 배양 챔버 19로 펌프 15에 의하여 신선한 충전을 받는다.

- <32> 배양 캐리어 흐름 루프 1에서 배양 캐리어는 그 챔버 19와 배양 캐리어 흐름 루프 1 주위를 살아있는 세포 배양을 통하여 순환된다. 이 루프 1에서 조정은 세포 반응기 챔버 19 내를 일정한 조건들로 유지하는 화학적 센서들(도시 안함)과 반응하여서 만들어진다. 이산화탄소 압력 조절과 산 또는 염기의 첨가는 pH를 조정한다. 세포 호흡을 유지하기 위하여 산소, 질소, 이산화탄소는 가스교환기 시스템(도시 안함)에서 용해된다. 닫힌 루프 1은 산소를 첨가하고 순환하는 가스 콘덴서(capacitance)로부터 이산화탄소를 제거한다. 비록 도 1이 본 발명에서 사용될 수 있는 배양 캐리어 흐름 루프의 바람직한 한 실시예이지만, 본 발명은 그것에 제한되지 아니한다. 생물반응장치에 산소, 영양분, 버퍼, 신선한 배지, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬과 같은 그러나 이에 한정되지 아니하는 배양 캐리어 요소들의 입력은 수동적으로, 자동적으로 또는 노폐물과 이산화탄소의 조절과 제거와 같은 다른 조절 수단에 의하여 수행될 수 있다.
- <33> 도 2와 도 3은 융합된 시변 전자기력 공급원을 가지는 TVEMF-생물반응장치 10의 바람직한 실시예를 도시한다. 도 4는 바람직한 형태로 본 발명에서 사용하기 위한 회전할 수 있는 TVEMF-생물반응장치 10의 단면도이다. 도 4의 TVEMF-생물반응장치 10은 융합된 시변 전자기력 공급원을 나타낸다. 또한 도 5는 융합된 시변 전자기력 공급원을 가지는 TVEMF-생물반응장치의 바람직한 실시예를 도시한다. 도 6-8은 인접한 시변 전자기력 공급원을 가진 회전하는 생물반응장치를 나타낸다.
- <34> 도 2는 본 발명의 TVEMF-생물반응장치 10의 바람직한 실시예의 입면도를 나타낸다. 도 2는 베이스 112에 의하여 지지되는 모터 하우징 111을 포함한다. 모터 113은 모터 하우징 111 내부에 부착되어 있고 1차 와이어 114와 2차 와이어 115에 의하여 그곳에 조절 수단들을 가지는 조절 박스 116에 연결되고 그것에 의하여 모터 113의 속도는 조절 손잡이 117을 회전하여 증분적으로( incrementally) 조절될 수 있다. 그 모터 하우징 111은 모터 113을 내부에 배치하여 모터 축 118이 하우징 111를 통하여 뻗어서 모터 축 118을 종단적(longitudinal)으로 하여서 그 축 118의 중심이 프라스틱을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 투명 물질로 바람직하게는 만들어진 종단적 챔버 119의 위치에서 지구 면에 평행하게 한다.
- <35> 이 바람직한 실시예에서 그 종단적 챔버 119는 그 축 118에 연결되어서 지구 면에 그 챔버 119가 평행한 종단축을 가지는 그것의 종단축에 대하여 회전하게 한다. 그 챔버는 와이어 코일 120에 감겨져 있다. 그 와이어 코일 120의 크기 및 그것이 감긴 횟수는 바람직하게는 0.1mA에서 1000mA의 구형파(square wave) 전류가 와이어 코일 120에 공급될 때 그 챔버 119 내에 바람직하게는 0.05에서 6 가우스의 시변 전자기력이 발생하는 정도이다. 그 와이어 코일 120은 와이어 123과 124에 의하여 그 축 118의 말단에서 1차 링 121과 2차 링 122에 연결된다. 이들 링 121, 122는 그 후에 전류가 그 코일 120에 계속 공급될 때 그 챔버 119가 회전하는 형태로 1차 전자기 운반 와이어 125와 2차 전자기 운반 와이어 128에 의하여 접촉된다. 전자기 생성 장치 126은 그 와이어 125, 128에 연결된다. 그 전자기 생성 장치 126은 전자기 생성 장치 손잡이 127을 회전하여 그것의 출력을 조절하여서 와이어 125, 128에 구형파를 제공한다.
- <36> 도 3은 본 발명에서 사용된 도 2에 도시된 TVEMF-생물반응장치 10의 측면 투시도이다.
- <37> 회전하는 TVEMF-생물반응장치 10은 그 안에 제대할 혼합물을 포함하기 위하여 채택되고 바람직하게는 투명한 배양 챔버 230을 가지며 도 4에 기재되었으며, 내부 실린더 관형(tubular) 유리 요소 293과 외부 관형 유리 요소 294를 수용하기 위하여 배열된 마주보는 1차 228과 2차 229 말단 표면을 가지는 1차 290과 2차 291 실린더형 가로축 말단 캡 요소를 포함하는 외부 하우징 220을 더욱 포함한다. 적당한 압력 밀봉이 제공된다. 내부 293과 외부 294 관형 요소 사이에 세포 성장을 위한 적당한 온도를 얻기 위하여 이용되는 고리모양의 와이어 히터가 존재한다. 그 와이어 히터 296은 배양 챔버 230에 시변 전자기장을 제공하는 전자기력 장치로서 사용될 수 있으며 또는 도 5에 기재된 것과 같이 분리된 와이어 코일 144는 시변 전자기력을 제공하는데 사용될 수 있다. 그 1차 말단 캡 요소 290과 2차 말단 캡 요소 291은 그 챔버 230 내에서 그 혼합물의 부드러운 흐름을 촉진하기 위하여 말단 표면 228, 229에 연결된 내부 커브 표면을 가진다. 1차 말단 캡 요소 290과 2차 말단 캡 요소 291은 각각 입력 축 223과 출력 축 225에 대하여 각각 회전적으로 수용되는 1차 중앙 용액 전달 저널(journal) 요소 292와 2차 중앙 용액 전달 저널 요소 295를 각각 가진다. 각 전달 저널 294, 295는 말단 캡 요소 290, 291 내에 오목한 카운터 보어에 위치하기 위한 플랜지를 가지고 축 223, 225에 대한 종단적 운동에 대하여 1차 잠금 워셔 및 링 297과 2차 잠금 워셔와 링 298에 의하여 부착된다. 각 저널 요소 294, 295는 종단적으로 뻗어나와 완곡의 배열된 통로에 연결된 중간 고리형 오목한 곳(recess)을 가진다. 저널 요소 292, 295 내에 각 고리형 오목한 곳은 각각 말단 캡 요소 290과 291에 1차 방사상으로 배열된 통로 278과 2차 방사상으로 배열된 통로 279에 의하여 1차 입력 커플링 203과 2차 입력 커플링 204에 각각 연결된다. 방사상 통로 278 또는 279 내의 캐리어는 저널 요소 294 또는 295 내의 종단적 통로 및 고리형 오목한 곳을 통하여 흘러서 그 접근이 축 223, 225에 대하여 완곡

한(circumferential) 저널 292,295의 각 말단에 저널 요소 292,295을 통하여 캐리어를 진입하게 한다.

- <38> 입력 223과 출력 225 축 상에 외부 하우징 220을 상대적으로 지지하는 볼 베어링들을 함유하는 1차 관형 베어링 하우징 205와 2차 관형 베어링 하우징 206이 말단 캡 요소 290과 291에 부착된다. 1차 베어링 하우징 205는 입력 223과 출력 225 축 그리고 종단축 221에 대하여 회전 방향으로 외부 하우징 220에 회전 드라이브를 제공하는 부착된 1차 스포로켓(sprocket) 기어 210을 가진다. 1차 베어링 하우징 205와 2차 베어링 하우징 206은 또한 와이어 히터 296과 다른 센서의 전기적 테이크 아웃을 제공한다.
- <39> 내부 여과 어셈블리 235는 그들의 길이를 따라서 구멍이나 입구(aperture)들을 가지는 내부 215 및 외부 216 관형 요소를 포함하고 구멍을 가진 1차 217 및 2차 218 내부 여과 어셈블리 말단 캡 요소를 가진다. 내부 관형 요소 215는 서로 맞물려서 중앙에 위치한 커플링 섹션을 가지는 두 부분(piece)으로 구성되고, 각 부분은 말단 217 또는 218에 부착한다. 외부 관형 요소 216는 1차 217과 2차 내부 여과 어셈블리 말단 캡 사이에 설치된다.
- <40> 말단 캡 요소 217, 218은 각각 입력 축 223과 출력 축 225 상에 회전될 수 있게 지지된다. 내부 요소 215는 핀과 인터피팅 홈(interfitting groove) 219에 의하여 출력 축 225에 회전하게 부착된다. 10 마이크론 위브(weave)를 가지는 폴리에스테르 천 224는 외부 요소 216의 외부 표면에 배치되고, 각 말단에서 0-링에 부착된다. 내부 요소 215는 출력 드라이브 축 225 내 슬롯에 커플링 핀에 의하여 핀에 결합되기 때문에, 출력 드라이브 축 225는 내부 요소 215를 회전할 수 있다. 내부 요소 215는 외부 요소 216을 지지하는 1차 217과 2차 218 말단 캡에 의하여 연결된다. 출력 축 225는 고정된 하우징 240 내에 베어링을 통하여 뻗어있고 1차 스포로켓 기어 241에 연결된다. 설명한 바와 같이, 용액 캐리어의 흐름이 내부 요소 215로부터 고정 하우징 240을 통하여 배출될 수 있게 출력 축 225는 밀봉 사이에 위치한 첫째 고정된 하우징 240에 1차 포트 또는 통로 289로부터 내부 요소 215로 뻗어있는 관형 구멍들 222을 가진다.
- <41> 외부 하우징 220의 저널 292,295 및 내부 요소 235에 대한 1차 217과 2차 218 말단 캡은 브레이드 요소 50a 및 50b에 대한 1차 227 및 2차 226 허브이다. 입력 축 223 상 2차 허브 226은 2차 허브 226이 입력 축 223에 회전하게 핀 231에 의하여 입력 축 223에 연결된다. 각 허브 227, 226는 허브를 통하여 캐리어 전달을 위한 축방향으로 펼쳐진 통로를 가진다. 입력 축 223은 입력 축 223의 토타테이블(Totatable) 서포트를 위한 2차 고정 하우징 내에 베어링을 통하여 뻗는다. 2차 종단(longitudinal) 통로 267는 입력 축 223을 통하여 면판과 하우징 260 사이에 2차 고리형 오목한 곳 232에 위치한 링과 보유(retaining) 위셔의 위치 중간체로 뻗는다. 2차 말단 캡 요소 291 내의 3차 방사상 통로 272는 오목한 곳의 용액 캐리어를 2차 말단 캡 요소 291로부터 나가게 한다. 도시하지는 않지만 3차 통로 272는 관(piping)과 Y 조인트를 통하여 통로 278과 279 서로를 연결한다.
- <42> 도 4에 도시된 샘플 포트에서 1차 축을 따라 뻗은 1차 구멍(bore) 237은 그 챔버 230의 코너 233을 교차하고 제한된 입구(opening) 234를 형성한다. 그 구멍(bore) 237은 실린더 밸브 요소 236을 나선적으로(threadedly) 수용하기 위한 한 말단에 나선 링과 카운터보아를 가진다. 그 밸브 요소 236은 입구 234를 연결하는 상보적으로 형성된 턱을 가지고 챔버 230의 내부로 조금 뛰어나온다. 밸브 요소 236 상의 0-링 243은 밀봉을 제공한다. 2차 축을 따라 2차 구멍(bore) 244는 0-링 243과 입구 234 사이의 위치에서 2차 구멍 237을 교차한다. 에라스토머 또는 플라스틱 스톱퍼 245는 2차 구멍 244를 닫고 샘플을 제거하기 위한 피하 주사기로 들어가질 수 있다. 샘플을 제거하기 위하여, 그 밸브 요소 236은 입구 234와 구멍 244에 접근하기 위하여 후퇴된다. 다음으로 주사기는 샘플을 추출하기 위하여 사용될 수 있고 그 입구 234는 다시 닫힐 수 있다. 그 TVEMF-생물반응장치 10의 내부에 외부 오염원이 도달할 수 없다.
- <43> 조작에서 캐리어는 축 통로에 대한 통로 266 또는 2차 포트에 투입되고 3차 방사상 통로 272를 통하여 1차 방사상 배열된 278과 2차 방사상 배열된 통로 279에 투입된다. 그 캐리어가 저널 292, 294 내 종단 통로를 통하여 챔버 230에 들어갈 때, 그 캐리어는 허브 227, 228의 말단 표면 228, 229에 작용하고 허브 227, 226 내의 통로를 통하여 축방향 뿐 아니라 방사상으로 퍼진다. 허브 227, 226를 통과한 캐리어는 말단 캡 요소 217, 218에 작용하고 방사상으로 퍼진다. 따라서 들어간 용액 캐리어의 흐름은 종단축 221로부터 방사상으로 밖으로 향하고, 통로 266과 289를 통하여 내보내기 위하여 여과 어셈블리 235 내의 입구와 폴리에스테르 천 224를 통하여 각 말단에서 출구 쪽으로 도넛형(toroidal)으로 흐른다. 외부 하우징 220, 챔버 230 및 내부 여과 어셈블리 235의 회전 방향과 회전속도를 조절하여서 원하는 형태의 캐리어 작용을 얻을 수 있다. 그러나 중요한 것은 클리노스타트(clinostat) 조작이 신선한 용액 캐리어의 연속적인 공급과 함께 얻어질 수 있다.
- <44> 만약 융합된 고리형 와이어 히터 296을 사용하여 시변 전자기력을 적용할 수 없다면 또 다른 바람직한 시변 전자기력 공급원에 의하여 적용될 수 있다. 예를 들어 도 6-8은 융합된 시변 전자기력을 가지지 아니하고 인접한 시변 전자기력 장치를 가진 생물반응장치에서 전자기력을 세로 배양에 제공하는 시변 전자기력 장치 140을 도시

한다. 특히, 도 6은 시변 전자기력 장치 140의 바람직한 실시예이다. 도 6은 서포트 베이스 145, 그 서포트 146 주위를 감싼 와이어 코일 147을 가지는 서포트 145에 지지된 실린더 코일 서포트 146을 포함하는 장치 140의 투시 입면도이다. 도 7은 도 6에 기재된 시변 전자기력 장치 140의 정면 투시도이다. 도 8은 시변 전자기력 장치 140의 정면 투시도이고, 거기서 조작시에 전체 생물반응장치 148이 와이어 코일 147에 의하여 감 싸이고 서포트 베이스 145에 의하여 지지되는 실린더 코일 서포트 146으로 삽입되는 것을 보인다. 시변 전자기력 장치 140은 생물반응장치 148에 인접해 있어서, 시변 전자기력 장치 140은 재사용될 수 있고, 또 시변 전자기력 장치 140은 생물반응장치 148에 인접해 있어서, 그 장치 140은 모든 타입의 생물반응장치들에서 바람직하게는 회전하는 전자기력을 생성하는데 사용될 수 있다.

<45> 조작에서 TVEMF-증식 동안에, 본 발명의 TVEMF- 생물반응장치 10은 세포 배양 챔버에 제대혈 혼합물을 함유한다. TVEMF-증식 동안, 제대혈 혼합물 함유하는 챔버의 회전 속도는 그 제대혈 혼합물이 종단축에 실질적으로 유지할 수 있게 접근되고 조절될 수 있다. 회전 속도의 증가를 벽 충격을 방해하기 위하여 허락한다. 예를 들어서 만약 제대혈 혼합물 내의 제대혈 줄기 세포가 회전 사이클의 하향 부분에서 지나치게 안쪽으로 하향되고 회전 사이클의 상향 부분에서 과도하게 바깥쪽으로 향하고 불충분하게 상향되면 회전을 증가시키는 것이 바람직하다. 선택적으로 사용자는 제대혈 줄기 세포 3차원 배열 및 그들의 세포-세포 서포트 및 세포-세포 배열을 유지하기 위하여 최소한 벽 충돌 빈도 및 강도를 조성하는 회전 속도를 바람직하게 선택할 수 있게 한다. 본 발명의 바람직한 속도는 5에서 120 RPM이고 더욱 바람직하게는 10에서 30 RPM이다.

<46> 그 제대혈 혼합물은 바람직하게는 투명한 배양 챔버를 통하여 바람직하게는 육안으로 접근되고 수동적으로 조작될 수 있다. 그 제대혈 혼합물의 접근과 조절은 TVEMF- 생물반응장치 10 내에 제대혈 줄기 세포들의 위치를 모니터링하는 센서(예를 들어, 레이저)에 의하여 자동화될 수 있다. 너무 많은 세포 운동을 나타내는 센서 리딩은 자동적으로 회전 속도를 조절하는 기작을 야기할 것이다.

<47> 또 조작에서 본 발명은 구형과 출력이 제대혈 혼합물 함유 챔버 내의 바람직한 전자기장 바람직하게는 0.05 가우스에서 6 가우스 범위를 생성하게 전자기 생성 장치가 켜지고 조절된다는 것을 생각한다.

<48> 본 발명의 범위를 벗어나지 아니하고 본 발명에서 생각되는 시변 전자기력에 종속되는 회전 생물반응장치들의 다양한 변화가 만들어 질 수 있기에 상기 기재에 포함된 모든 내용은 예시적으로 해석되고 제한적으로 해석되지 아니한다.

<49> 본 발명의 바람직한 실시예의 상세한 설명

<50> 하기 정의들은 본 발명의 내용에서 정의된 용어들의 이해와 설명을 돕기 위한 것이다. 그 정의들은 본 명세서를 통하여 기재된 것보다 적게 이들 용어들을 한정하기 위한 것이 아니다. 또한 이점에 있어서 TVEMF-정의들과 관련된 몇 가지 정의들은 서로 상보적으로 해석되어야 하지 서로 상반되기 해석되어서는 안 된다.

<51> 본 명세서를 통하여 사용된 "성체 줄기 세포"라는 용어는 미분화되고 더 분화된 세포들이 될 수 있는 전분화능(pluripotent) 세포를 의미한다. 본 발명에 관하여, 성체 줄기 세포는 바람직하게는 CD34+/CD38-이다.

<52> 본 명세서에서 사용된 "제대혈"이란 용어는 태아 또는 신생아의 태반 및/또는 탯줄로부터 유래한 혈액을 의미하고 줄기세포의 가장 풍부한 공급원 중 하나이다. "코드(cord)"는 본 발명의 "제대혈"이란 용어를 탯줄로부터 유래한 혈액으로 한정되어서는 안된다 본 명세서를 통하여 설명된 바와 같이, 태아' 또는 신생아'의 태반의 혈액은 제대혈의 혈액으로 컨플루언트(confluent)하다. 본 발명을 위하여, 동일한 순환 루프의 여러 부분들에 위치한 혈액들 사이를 구별할 이유는 없다.

<53> 본 명세서에서 사용된 "제대혈 세포"라는 용어는 제대혈로부터 유래한 세포를 의미한다. 제대혈 세포들은 TVEMF-생물반응장치에서 TVEMF-증식을 수행할 수 있는 복제능을 가지고, 본 발명의 조성물에서 존재할 수 있다.

<54> 본 명세서에서 사용된 "제대혈 줄기 세포"라는 용어는 제대혈로부터 유래한 성체 줄기 세포를 의미한다. 제대혈 줄기 세포들은 또 체세포 줄기세포로 알려졌고 배아로부터 직접 유래한 배아 줄기 세포가 아니다. 바람직하게는 본 발명의 제대혈 줄기 세포는 CD34+/CD38- 세포이다.

<55> 본 명세서에서 사용된 "제대혈 줄기 세포 조성물"이란 용어는 자연에서 일어나는 제대혈 줄기세포와 동일하거나 유사한 3차원 형태 및 세포-세포 형태 및 세포-세포 서포트를 가지고 자연계에서 일어나는 제대혈 공급원보다 부피 당 수가 적어도 7배 이상이거나 상기 언급한 형태 및 서포트를 유지하며 TVEMF-증식을 진행하는 본 발명의 제대혈 줄기 세포를 의미한다. 제대혈 줄기 세포들과 함께 약학적으로 수용가능한 담체, 혈장, 혈액, 알부민, 세포 배양 배지, 성장 인자, 구리 킬레이트제, 호르몬, 버퍼, 냉동보존제 또는 일부 다른 물질과 같은 어느 정

도의 캐리어가 있다. 자연계에서 발생하는 제대혈에 대한 참고는 바람직하게는 본 발명의 제대혈 줄기 세포들과 그들의 원래 제대혈 공급원을 비교하는 것이다. 그러나 만약에 그러한 비교가 가능하지 않으면, 자연계에서 일어나는 제대혈은 바람직하게는 본 발명의 제대혈 줄기세포의 공급원과 동일한 포유류의 평균 또는 전형적인 특징의 제대혈을 의미할 수 있다.

- <56> 본 명세서에서 사용된 "제대혈 혼합물"이란 용어는 TVEMF-생물반응장치 (예를 들어 세포 배양 챔버에)에 위치할 세포의 성장 배지와 같은 세포들을 증식하게 하는 물질과 제대혈 세포의 혼합물을 의미한다. 그 제대혈 세포들은 세포 배양 배지와 같은 물질로 전체 제대혈을 단순하게 혼합하여 제대혈 혼합물에 존재할 수 있다. 또한 그 제대혈 혼합물은 본 명세서를 통하여 기재된 바와 같이 제대혈 줄기세포를 포함하는 제대혈로부터 유래한 세포 조제물(preparation)로 제조될 수 있다. 바람직하게는 그 제대혈 혼합물은 CD34+/CD38- 제대혈 줄기 세포들과 Dulbecco's 배지(DMEM)를 포함한다. 바람직하게는 적어도 제대혈 혼합물의 절반은 DMEM와 같은 세포 배양 배지이다.
- <57> 본 명세서에서 사용된, "TVEMF"이란 용어는 "시변 전자기력(Time Varying Electromagnetic Force)"을 의미한다.
- <58> 본 명세서에서 사용된 "TVEMF-생물반응장치"이란 용어는 상기 도면의 설명에서 더 완전하게 기재된 것과 같이 회전 생물반응장치를 의미한다. 생물반응장치에 적용되는 TVEMF는 바람직하게는 0.05에서 6.0 가우스 범위이고 더욱 바람직하게는 0.05-0.5 가우스이다. TVEMF-생물반응장치의 실시예(비한정적인)에 대해서는 예를 들어 도 2,3,4,5를 참고할 것. 간단한 실시예에서, 본 발명의 TVEMF-생물반응장치는 적당한 가우스 레벨(TVEMF가 적용된)에서 동봉한(enclosed) 제대혈 혼합물의 회전을 제공하고 거기서 제대혈 세포들(줄기 세포들을 포함)을 증식하게 한다. 바람직하게는 TVEMF-생물반응장치는 성장 배지의 교환(바람직하게는 첨가물로)와 제대혈 혼합물의 산소화를 제공한다. 그 TVEMF-생물반응장치는 수일 이상 세포의 성장 기작을 제공한다. 그 TVEMF-생물반응장치는 생물반응장치 내의 세포들을 TVEMF를 받게하여서 TVEMF가 세포를 통과하여서 TVEMF-증식을 진행한다.
- <59> 본 명세서에서 사용된 "TVEMF-증식된 제대혈 세포들"이란 용어는 TVEMF-생물반응장치에 놓여진 후에 부피 당 수(즉 농도)가 증가되고 약 0.05에서 6.0 가우스의 TVEMF를 받은 제대혈 세포를 의미한다. 부피 당 세포의 수의 증가는 TVEMF-생물반응장치의 세포 복제의 결과이고, 따라서 생물반응장치의 전체 세포의 수는 증가한다. 부피 당 세포 수의 증가는 예를 들어 혈액의 부피를 70ml에서 10ml로 단순한 감소에 기인한 것이 아니어서 ml 당 세포 수의 증가에 기인한 것이다.
- <60> 본 명세서에 사용된 "TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들"이란 용어는 TVEMF-생물반응장치에 놓여진 후에 부피 당 수(즉 농도)가 증가되고 약 0.05에서 6.0 가우스의 TVEMF를 받은 제대혈 세포를 의미한다. 부피 당 줄기 세포들의 수의 증가는 TVEMF-생물반응장치에서 세포 복제의 결과이고, 생물반응장치에서 줄기 세포들의 총수는 증가한다. 부피당 세포 수의 증가는 예를 들어 혈액의 부피를 70ml에서 10ml로 단순한 감소에 기인한 것이 아니어서 ml 당 세포 수의 증가에 기인한 것이다.
- <61> 본 명세서에서 사용된 "TVEMF-증식하는"이라는 용어는 TVEMF(회전) 생물반응장치에서 TVEMF 존재 하에서 TVEMF-생물반응장치에서 세포들의 복제(분열 및 성장) 단계를 의미한다. 제대혈 줄기 세포들(바람직하게는 CD34+/CD38- 줄기 세포들)은 바람직하게는 더 분화로 진행되지 아니하고 복제된다.
- <62> 본 명세서에 사용된 "TVEMF-증식"이라는 용어는 TVEMF에 세포를 약 0.05에서 6.0 가우스의 TVEMF를 받아서 TVEMF-생물반응장치 내의 제대혈 세포, 바람직하게는 제대혈 줄기 세포들 수를 증가시키는 과정을 의미한다. 바람직하게는 제대혈 세포, 바람직하게는 제대혈 줄기 세포들 수의 증가는 원래 제대혈 공급원의 부피 당 수(즉 농도)의 7배 이상이다. 본 발명에 따른 TVEMF-생물반응장치에서 제대혈 줄기 세포들의 증식은 TVEMF-증식 전에 제대혈 줄기세포와 동일한 3차원 형태 및 세포-세포 형태 및 세포-세포 서포트를 필수적으로 가지거나 유지된 제대혈 줄기세포를 제공한다. TVEMF-증식의 다른 특징은 본 발명의 제대혈 줄기세포의 예외적인 특징을 제공할 수도 있다. 이론에 의하여 제한되지 아니하고, TVEMF-증식은 그들의 3차원 형태 및 세포-세포 서포트를 유지하는 높은 농도의 제대혈 줄기 세포들을 제공하지만은 않는다. 이론에 의하여 한정되지 아니하고, TVEMF는 예를 들어 성장을 촉진시키는 유전자를 업-레귤레이션하고, 성장을 저해하는 유전자를 다운-레귤레이션하는 것과 같은 TVEMF-증식 동안 줄기세포들의 일부 성질에 영향을 줄 수 있다. 전체적으로 TVEMF-증식은 성장을 촉진하나 전체 분화를 야기하지는 않는다.
- <63> 본 명세서에 사용된 "TVEMF-증식된 세포"라는 용어는 TVEMF-증식 과정을 거친 세포를 의미한다.
- <64> 본 명세서에 사용된 "독성 물질" 또는 관련된 용어는 세포 바람직하게는 제대혈 줄기 세포 또는 환자에 독성을

가지는 물질을 의미하고 특히, 독성 물질이란 용어는 제대혈(예를 들어, 식클(sickle) 세포, 모 혈액 또는 모 오줌 또는 다른 조직 또는 노폐물)에 독특하게 또는 특이하게 존재할 수 있는 물질뿐 아니라 죽은 세포, 매크로 파지를 의미한다. 다른 독성 물질도 본 명세서에서 기재된다. 혈액으로부터 이들 물질의 제거는 당업계에 주지된다. 본 명세서에 사용된 상기 정의된 용어 또는 다른 용어들에 대한 다른 기재는 상기의 정의들에 의하여 제한되지 아니하고 그 정의에 기여될 수 있다. 본 발명의 여러 특징에 대한 정보는 본 명세서에서 제공되고 단지 그것이 포함된 부분에만 제한되는 것이 아니라 전체적으로 본 발명의 이해에 기여되는 것을 의미한다.

**실시예**

- <73> 본 발명은 인간의 조직을 복구, 보충(replenishing) 및 재생을 위한 신속하게 이용할 수 있는 TVEMF- 증식된 제대혈 줄기 세포들의 신속하게 이용할 수 있는 공급원을 제공하는 것이다. 본 발명은 하기에서 기재하는 바람직한 실시예에 의하여 더욱 완전하게 기재되지만 그것에 제한되지 아니한다.
- <74> **작동 방법 -TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물 제조, 및 그 조성물의 사용**
- <75> 본 발명의 바람직한 실시예에서, 조직을 복구, 대체 및 재생하여 인체를 보조할 수 있거나 연구에 유용한 TVMF-증식된 제대혈 줄기 세포들을 제조하는 방법을 기재한다.
- <76> 포유류, 바람직하게는 영장 포유류, 더욱 바람직하게는 사람으로부터 바람직하게는 주사기 방법에 따라서 수집된 제대혈이 예로서 본 명세서에 기재된다. 제대혈 예를 들어 생명을 위협하는 상황이나 임신 3삼분기 동안에 나타나는 결함(예를 들어 귀 결함)과 같은 극단적인 상황에서 자궁으로부터도 수집될 수 있어서, 출생에 필요하거나 신생아의 출생 직후에 필요하다면 제대혈 줄기 세포들은 증식되고 용이하게 이용될 수 있다. 자궁에서 제대혈은 미출생 신생아에 위협하지 않은 정도의 양만이 제거된다. 본 발명에 따른 제대혈의 수집은 예를 들어 포유류 제대혈을 직접 수집하는 다른 수단 또는 예를 들어 "혈액 은행"으로부터 냉동보관된 피를 포함하는 상업적 또는 다른 공급원으로부터 혈액을 얻어서 혈액을 간접적으로 얻는 것을 포함하나 이에 한정되지 아니한다.
- <77> 바람직하게는 적혈구들은 제대혈로부터 제거되고 제대혈 줄기 세포들을 포함하는 나머지 세포들은 여기에 기재된 바와 같이 TVEMF-생물반응장치 ("제대혈 혼합물" 참조)내에 적당한 배지와 함께 놓인다. 본 발명의 더욱 바람직한 실시예에서, 단지 상기 기재된 "버피 코트" (본 명세서에서 기재된 제대혈 줄기 세포들을 포함)만이 TVEMF-생물반응장치에 놓인다. 다른 제대혈 조제물을 제조하기 위하여 다른 실시예들은 다른 비-줄기 세포와 제대혈의 구성요소들을 제거하는 것을 포함한다. 그러한 제대혈 조제물은 유일하게 남아있는 제대혈 구성요소로 CD34+/CD38- 제대혈 줄기 세포들만을 가질 수 있다. 제대혈 세포들의 비-줄기 세포 타입의 제거는 침전법과 원심분리와 같은 그러나 이에 한정되지 아니하는 네가티브 기술을 통하여 달성될 수 있다. 많은 네가티브 분리 방법들이 당업계에 주지된다. 그러나 포지티브 선택 방법들도 사용될 수 있고 본 발명에서 바람직하다. 혈액의 여러 구성요소를 제거하고 CD34+/CD38-를 포지티브하게 선택하는 방법들은 당업계에 공지되고 원하는 제대혈 줄기 세포들에 비가역적으로 해롭거나 그 세포를 파괴하지 않는한 사용될 수 있다. 예를 들어, CD34+/CD38-에 대한 선택적 친화 방법이 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 기재된 "버피 코트"가 제대혈로부터 제조되고 CD34+/CD38- 세포는 TVEMF-증식을 위하여 버피 코트로부터 분리된다.
- <78> 상기 기재된 수집된 제대혈 또는 바람직한 세포 부분들은 TVEMF-증식이 일어나게 TVEMF-생물반응장치 내로 위치하여야 한다. 상기에 기재된 바와 같이, "제대혈 혼합물"이란 용어는 TVEMF-생물반응장치에 놓여질 세포 성장 배지와 같은 세포들의 증식을 가능하게 하는 물질과 제대혈(또는 원하는 세포 부분, 예를 들어 적혈구 없는 제대혈 또는 바람직하게는 제대혈로부터 분리된 CD34+/CD38- 제대혈 줄기 세포들)의 혼합물을 포함한다. 세포가 성장하고 증식하는 것을 가능하게 하는 배지인 세포 배양 배지는 당업계에 주지된다. 바람직하게는, 세포가 증식하기하는 물질이 세포 배양 배지이고 더 바람직하게는 Dulbecco' 배지이다. 물론 세포 배지 성분들은 세포를 사멸하거나 손상해서는 안된다. 다른 구성 성분들도 물론 TVEMF-증식 전 또는 증식 중에 제대혈 혼합물에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 그 제대혈은 생물반응장치 Dulbecco 배지와 생물반응장치에 놓여질 수 있고, 5% (또는 일부 다른 바람직한 양으로는 예를 들어 약 1%에서 약 10%의 범위)의 인간 혈청 알부민이 더 보충될 수 있다. 제대혈 혼합물에 첨가되는 다른 첨가제들은 성장인자, 성장 인자, 구리 킬레이트제, 사이토카인, 호르몬 및 TVEMF-증식을 증가시키는 다른 물질들을 포함하나 이에 한정되지 아니하며 생물반응장치에 위치되기 전에 생물반응장치 외부 또는 내부에 첨가될 수도 있다. 바람직하게는 한 개체로부터 얻은 전체 부피의 제대혈(바람직하게 인간 제대혈에서는 약 10 ml에서 약 100 ml, 더욱 바람직하게는 50 ml에서 약 100 ml 제대혈)이 약 25 ml에서 약 100 ml의 5% 인간 혈청 알부민이 보충된 Dulbecco' 배지(DMEM)와 혼합되어서 전체 부피의 제대혈 혼합물은 생물반응장치에 위치할 때 약 75에서 약 200 ml이다. 일반적으로 더 많은 제대혈이 수집되면 더 좋고 만약 한 개체로부터 수집이 100 ml 이상이면 모든 그 소중한 제대혈의 사용이 바람직하다. 예를 들어 제대혈을 모아

서 많은 부피가 가능하면 일회 용량 이상이 바람직할 수 있다. 제대혈 수집이 모아지고 TVEMF-증식이 함께할 때 퍼퓨전 TVEMF-생물반응장치의 사용이 특히 유용하다.

- <79> "TVEMF-생물반응장치에 놓여짐"이란 용어는 제대혈 혼합물이 생물반응장치의 외부에서 완전하게 만들어져서 그 혼합물이 생물반응장치의 내부에 위치하는 것을 한정적으로 의미하는 것은 아니다. 또한 그 제대혈 혼합물은 전적으로 생물반응장치의 내부에서 혼합될 수 있다. 예를 들어 그 제대혈은 생물반응 장치에 이미 존재하거나 동시에 첨가되거나 혹은 생물반응장치에 제대혈 후에 첨가되는 5% 인간 혈청 알부민이 보충된 Dulbecco' 배지 (DMEM)와 함께 생물반응장치에 놓일 수 있다.
- <80> 본 발명의 바람직한 제대혈 혼합물은 하기를 포함한다: 제왕절개의 신생아로부터 수집한 제대혈 샘플의 버피 코트로부터 분리한 CD34+/CD38- 줄기 세포들; 및 그 CD34+/CD38- 세포들과 함께 Dulbecco 배지들을 포함하고 전체 부피는 약 200 ml이다. 심지어 더욱 바람직하게는 G-CSF (과립구 콜로니 자극 인자)를 제대혈 혼합물은 포함한다. 바람직하게는 G-CSF는 제대혈 줄기 세포들의 TVEMF-증식을 촉진할 정도의 충분한 양 존재한다. 더욱 바람직하게는 TVEMF-증식 전에 제대혈에 존재하는 G-CSF의 양은 약 25에서 약 200 ng/ml 혼합물, 더욱 바람직하게는 약 50에서 약 150 ng/ml, 이고 가장 바람직하게는 약 100 ng/ml이다.
- <81> TVEMF-생물반응장치 용기(제대혈 줄기 세포들을 포함하는 제대혈 혼합물을 포함)는 그들의 3차원 형태 및 세포-세포 형태 및 세포-세포 서포트를 유지하기 위하여 제대혈 줄기 세포들의 현탁액에 제공되는 속도로 회전한다. 바람직하게는 그 회전 속도는 5-120 rpm; 더욱 바람직하게는 10-30 rpm 이다. TVEMF-생물반응장치에서 세포가 있는 시간 동안에, 그들은 바람직하게는 영양분과 신선한 배지(DMEM 및 5% 인간 혈청 알부민)을 공급받고, 호르몬, 사이토카인 및/또는 성장인자(바람직하게는 G-CSF)에 노출되고 독성물질은 제거된다. TVEMF-생물반응장치의 제대혈 세포로부터 제거되는 독성물질들은 죽은 세포들의 과립 물질과 과립구 및 매크로파지의 독성물질이다. 그 세포의 TVEMF-증식은 그 세포들이 바람직하게는 적어도 7배 이상으로 증식되기에 충분한 시간 동안 증식(부피 당 수 또는 농도의 증가)될 수 있게 조절된다. 바람직하게는 제대혈 줄기 세포들(만약 존재한다면 다른 세포들과 함께)은 적어도 4일, 바람직하게는 약 7에서 14일, 더욱 바람직하게는 약 7에서 10일, 가장 바람직하게는 7일 동안 TVEMF-증식을 진행한다. TVEMF-증식은 TVEMF-생물반응장치에서 160일까지 계속될 수 있다. 심지어 TVEMF- 증식은 160일보다 더 긴 기간 동안 일어날 수 있으나 그러한 긴 증식은 본 발명의 바람직한 실시예에 있지 않다.
- <82> 바람직하게는 TVEMF-증식은 약 26에서 약 41°C의 온도에서 더욱 바람직하게는 37°C 온도에서 TVEMF-생물반응장치에서 수행된다.
- <83> TVEMF-증식을 겪는 세포들의 전체 증식을 모니터링하는 한 방법은 육안관찰에 의한 것이다. 제대혈 줄기 세포들은 전형적으로 짙은 붉은색이다. 바람직하게는 제대혈 혼합물을 형성하는데 사용된 배지는 옅은 또는 투명색이다. 일단 그 생물반응장치가 회전하기 시작하고 TVEMF가 적용되면 세포들은 생물반응장치 용기에 중앙에 색깔을 띤 세포의 군으로 둘러싸인 배지를 가지고 바람직하게는 모인다. 종종 산소화 및 다른 영양분 첨가는 종종 생물반응장치에 있는 관찰 창(일반적으로 투명한 플라스틱)을 통하여 세포군집을 관찰할 수 있는 능력을 흐리게 하지 않는다. 군의 형성은 줄기 세포들이 그들의 3차원 형태 및 세포-세포 서포트 및 세포-세포 형태를 유지하는 것을 돕는데 중요하다; 만약 군들이 흩어지고 세포가 생물반응장치 용기의 벽에 접촉하기 시작하면, 그 세포들의 군을 중앙에 다시 형성하기 위하여 그 회전 속도는 증가된다(수동 또는 자동적으로). TVEMF-생물반응장치의 세포들의 대략적인 수 증가를 나타내기 위하여, 형성 직후 채취한 세포 군의 보이는 지름을 나중의 군 지름과 비교할 수 있다. TVEMF 증식 동안 세포의 수의 증가의 측정은 당업계에서 공지된 것과 같은 여러 가지 방법으로 가능할 수 있다. 군 사이즈의 증가를 모니터링하고 측정하기 위한 자동 센서가 TVEMF-생물반응장치에 또한 포함될 수 있다. 그 TVEMF-증식 과정은 예를 들어 생물반응 장치 내부에 군집화된 세포를 보증하는 세포 군집 형성을 체크할 실험 전문가에 의하여 조심스럽게 모니터링될 수 있고 세포 군집이 쪼개지기 시작하면 생물반응장치의 회전을 증가시킬 것이다. 생물반응장치 내부에서 제대혈 혼합물의 점도 및 세포 군집을 모니터링하는 자동 시스템이 또한 그 세포 군집을 모니터링할 수 있다. 세포 군집의 점도의 변화는 TVEMF-증식 과정 시작 후 약 2일에 나타날 수 있고, TVEMF-생물반응장치의 회전 속도는 그 시기 경에 증가될 수 있다. TVEMF-생물반응장치 스피드는 TVEMF-증식을 통하여 변화될 수 있다. 바람직하게는, 그 회전 스피드는 TVEMF- 증식을 겪은 세포들이 TVEMF-생물반응장치 용기의 벽에 접촉하지 않게 적절하게 조절된다. 또 실험 전문가들은 예를 들어서 상기 기재한 바와 같은 신선한 배지 및 바람직하게는 영양분 및 성장인자와 같은 원하는 첨가물을 생물반응장치 속에 하루에 한번 또는 이틀에 한번 수동으로(예를 들어 주사기를 사용) 집어 넣고, 세포 노폐물 및 독소를 포함한 기존 배지를 뽑아낸다. 또 신선한 배지 및 다른 첨가물들은 TVEMF-증식 동안에 TVEMF-생물반응장치 속으로

자동적으로 펌프될 수 있고 노폐물들도 자동적으로 제거될 수 있다.

- <84> 제대혈 줄기 세포들은 TVEMF-생물반응장치 및 TVEMF-증식된 곳에 놓인 약 7일에서 약 14일 후에 그들의 원래 수의 적어도 7배 증가될 수 있다. 바람직하게는 그 TVEMF-증식은 7일에서 10일간 지속되고 더욱 바람직하게는 약 7일간 지속된다. 줄기 세포들의 수의 측정은 따라서 TVEMF- 증식 동안에 취할 필요는 없다. 본 명세서를 통하여 상기에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 자연계에서 존재하는 비-TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들과 필수적으로 동일한 3차원 형태 및 세포-세포 서포트 및 세포-세포 형태를 가진다.
- <85> 본 발명의 또 다른 실시예는 인체 시스템 또는 조직이 예를 들어 본 명세서에서 기재된 조직의 복구, 보충 및 재생을 보조하는 기능을 하는 체외 포유류 제대혈 줄기 세포 조성물에 관한 것이다. 그 조성물은 그것의 원래 유래된 제대혈 내의 부피 당 제대혈 부피 당 수가 바람직하게는 적어도 7배 이상인 양의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들을 포함한다. 예를 들어서 바람직하게는 만약 제대혈 줄기 세포들의 수 X가 TVEMF-생물반응장치 속에 부피 당 놓여 있었다면, TVEMF-증식 후, TVEMF-생물반응장치 속에 놓여 있는 제대혈 줄기 세포들의 동일 부피 당 유래한 제대혈 줄기 세포들의 수는 적어도 7X이다. 이 적어도 7배의 증식은 본 발명이 작동하기 위하여 필요한 것은 아니지만, 이 증식은 특히 치료 목적에 바람직하다. 예를 들어서, 만약 바람직하다면 그 TVEMF-증식된 세포들은 자연계에서 존재하는 제대혈에서는 단지 제대혈 줄기 세포들의 수의 2배 일 수 있다. 바람직하게, TVEMF-증식된 세포들은 자연적으로 존재하는 제대혈에서 제대혈 줄기 세포들 부피 당 약 4배에서 25배 범위의 수이다. 본 발명은 또 포유류로부터 유래한 제대혈 줄기 세포들을 포함하는 조성물에 관한 것이고, 여기서 상기 제대혈 줄기 세포들은 포유류로부터 유래한 자연계에 존재하는 제대혈보다 적어도 7배 이상의 부피 당 수 존재하고; 여기서 그 제대혈 줄기 세포들은 자연계에서 존재하는 제대혈의 줄기세포와 필수적으로 동일한 3차원 형태 및 세포-세포 서포트 및 세포-세포 형태를 가진다. 본 발명의 조성물은 약학적으로 수용가능한 담체; 혈장, 혈액, 알부민, 세포 배지, 성장인자, 구리 킬레이트제, 호르몬, 버퍼 또는 냉동보존제를 포함할 수 있다. "약학적으로 수용가능한 담체(carrier)"는 포유류 바람직하게는 인간에 줄기세포들의 삽입을 가능하게 하는 물질을 의미한다. 그러한 담체는 특히 혈액 트랜스퓨전(transfusion)에 사용될 수 있는 물질, 예를 들어 그 조성물이 삽입될 포유류로부터 바람직하게는 유래한 혈액, 혈장, 알부민과 같은 여기에서 언급한 물질들을 포함한다.. 포유류에 조성물의 "삽입(introduction)"이라는 용어는 동물에 조성물을 "투여"한다는 것을 의미한다. "수용가능한 담체"는 일반적으로 포유류에 투여하기 전, 냉동보존 전 또는 후, TVEMF-증식 후에 그 세포에 독성을 띠지 아니하고 본 발명의 제대혈 줄기세포를 생존하게 하는 물질을 의미한다. 그러한 담체들은 당업계에 주지되고 본 명세서에 그러한 목적으로 기재된 물질들 예를 들어 혈장, 혈액, 알부민, 세포 배양 배지, 버퍼 및 냉동보존제를 포함하는 다양한 범위의 물질들이 본 발명의 수용가능한 담체일 수 있다. 그 원하는 담체는 그 원하는 목적에 부분적으로 의존할 수 있다.
- <86> 당업계에 공지된 다른 증식(TVEMF를 사용하지 아니함)은 제대혈 줄기 세포들을 3차원 형태 및 세포-세포 서포트를 유지하면서 자연계에서 존재하는 제대혈의 적어도 7배 이상의 제대혈 줄기세포의 증식을 제공하지 못한다. TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 그들이 유래한 제대혈과 필수적으로 동일한 3차원 형태 및 세포-세포 서포트 및 세포-세포 형태를 가지거나 유지된다. 그 조성물은 바람직하게는 냉동보존을 위한 용액 또는 Dulbecco' 배지 현탁액에 TVEMF-증식된 제대혈 줄기세포를 포함한다. 그 조성물은 바람직하게는 독성 과립 물질, 예를 들어 죽은 세포 및 과립구 및 마크로파지의 독성 물질 또는 내용물이 없다. 그 조성물은 -120℃에서 -196℃의 온도로 그 조성물의 온도를 감소시켜서 치료 또는 다른 용도로 필요할 때까지 그 온도에서 냉동보존된 조성물을 유지하는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기세포들을 포함하는 냉동보존된 조성물일 수 있다. 하기에서 기재하는 바와 같이 냉동보존 전에 그 조성물로부터 독성 물질은 가능하면 제거된다.
- <87> 본 발명의 또다른 실시예는 TVEMF-증식이 완성된 직후 또는 냉동보존을 겪은 TVEMF-제대혈 줄기 세포들의 조성물로 자가 면역 질환(상기에서 언급한)과 같은 질병의 치료 및/또는 조직을 재생하는 방법에 관한 것이다. 그 세포들은 그 세포들은 인체의 자연 시스템이 그 조직을 재생하거나 복구하게 복구되는 조직에 예를 들어 직접 또는 정맥내 주사되어 포유류 바람직하게는 인간의 몸에 투여될 수 있다. 바람직하게는 그 포유류에 투여되는 조성물은 투여되는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들에 부작용을 야기하는 물질이나 독성물질이 없다. 그 방법 (및 조성물)은 포유류 바람직하게는 인간을 복구하는데 사용될 수 있고, 그러한 잠재적인 사용을 가지는 생명유지에 필요한 기관 및 다른 조직은 간 조직, 심장 조직, 조혈 조직, 혈관, 피부 조직, 근육 조직, 장 조직, 척장 조직, 중추신경 세포, 뼈, 연골 조직, 결합 조직, 폐 조직, 비장 조직, 뇌 조직 및 다른 신체 조직을 포함하나 이에 한정되지 아니한다. 그 세포들은 치료 또는 연구에 사용될 수 있고 그러한 치료 또는 연구는 만약 질병이 발생하고 그 질병이 없는 세포가 필요한 경우에 그 개체의 혈구세포가 필요하다.

<88> 작동 방법 -냉동보관(Cryopreservation)

<89> 상기에서 언급한 바와 같이, 예를 들어 어린 포유류, 바람직하게는 인간 신생아의 출생 동안(더욱 바람직하게는 제왕절개에서)에 제대혈은 수집된다. 적혈구는 바람직하게는 그 제대혈로부터 제거된다. 그 제대혈 줄기 세포들(원하면 다른 세포 및 배지를 가지는)은 TVEMF-생물반응장치에 놓이고, 시변전자기력에 노출되고 증식된다. 증식 후에, 그 세포들은 극저온보관될 수 있다. TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물의 냉동보관에 관련된 좀더 자세한 것은 여기와 특히 하기에 제공한다. TVEMF-증식 후에, TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들을 포함하는 TVEMF-증식된 세포들은 바람직하게는 적어도 하나의 냉동보존제를 포함하는 냉동보존 용기에 바람직하게는 옮겨진다. 그 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 바람직하게는 TVEMF-증식 동안에 존재하는 배지와 다른 구성성분을 제거하기 위하여 용액(예를 들어서 버퍼 용액 또는 원하는 냉동보관 용액)으로 1차 세척하고, 그 후에 세포의 냉동보존을 가능하게 하는 용액에 넣는다. 그 세포들은 적당한 극저온 용기로 옮기고 그 용기의 온도를 -120℃에서 -196℃의 온도, 바람직하게는 -130℃에서 -150℃의 온도로 낮추어 그 온도에서 유지한다. 필요한 경우에, 그 세포들의 온도(즉 극저온 용기의 온도)를 인체에 투여할 양립하는 온도(일반적으로 상온 주위에서 체온 주위의 온도)로 올리고 TVEMF-증식된 세포들은 포유류 바람직하게는 인간에 예를 들어서 상기 기재된 것과 같이 투여한다.

<90> 세포의 냉동은 일반적으로 파괴적이다. 냉동시에 세포 내의 수분은 언다. 그 후 세포막에 대한 삼투 효과, 세포 탈수, 용매, 농축, 얼음 결정 형성에 의하여 손상이 일어난다. 세포 외부에 얼음이 형성되면, 가용 수분이 용액으로부터 제거되고 세포로부터 빠져나와서 삼투 탈수를 야기하고 결국은 세포를 파괴하는 용매 농축을 야기한다, Mazur, P., 1977, Cryobiology 14:251-272 참조.

<91> 여러 물질들이 다른 어는점을 가진다. 바람직하게는 냉동보존을 위한 제대혈 줄기 세포 조성물은 결정화 및 냉동 과정으로부터 세포벽 손상을 최소화하기 위하여 가능한 오염 물질을 포함하지 않는다.

<92> 이들 손상효과들은 (a)동결방지제의 사용, (b)동결 속도의 조절, 및 (c) 분해 반응을 최소화하기에 충분하게 낮은 온도에서 저장에 의하여 우회될 수 있다.

<93> 냉동보존제의 포함이 본 발명에서는 바람직하다. 사용될 수 있는 동결방지제들은 충분한 양의 디메틸설포사이드(DMSO) (Lovelock, J. E. and Bishop, M. W. H., 1959, Nature 183:1394- 1395; Ashwood-Smith, M. J., 1961, Nature 190:1204-1205), 글리세롤, 폴리비닐피롤리딘(Rinfret, A. P., 1960, Ann. N. Y. Acad. Sci. 85:576), 폴리에틸렌 글라이콜(Sloviter, H. A. and Ravdin, R. G., 1962, Nature 196:548), 알부민, 텍스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i- 에리스리톨, D-리비톨, D-만니톨(Rowe, A. W., et al., 1962, Fed. Proc. 21 :157), D-스울비톨, i-이노시톨, D-락토스, 콜린 클로라이드(Bender, M. A., et al., 1960, J. Appl. Physiol. 15:520), 아미노산-포도당 용액 또는 아미노산(Phan The Tran and Bender, M. A., 1960, Exp. Cell Res. 20:651), 메탄올, 아세트아마이드, 글리세롤 모노아세테이트(Lovelock, J. E., 1954, Biochem. J. 56:265), 및 무기 염들(Phan The Tran and Bender, M. A., 1960, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104:388; Phan The Tran and Bender, M. A., 1961, in Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, Ilbery, P. L. T., ed., Butterworth, London, p. 59)을 포함하나 이에 한정되지 아니한다. 바람직한 실시예에서, DMSO가 사용된다. 용액 DMSO는 저 농도에서 세포에 비독성이다. 소 분자로, DMSO는 자유롭게 세포를 통과하고 물과 결합하여서 세포내 소기관을 보호하고 그것의 냉동정도를 조절하고 얼음 형성으로부터의 손상을 예방한다. 혈장의 첨가(즉, 20-25%의 농도로)는 DMSO의 보호효과를 증가시킬 수 있다. DMSO 첨가 후에, 세포들은 약 1%의 DMSO 농도가 4℃ 이상의 온도에서는 독성을 가지므로 동결 때까지 0℃를 유지하여야 한다. 나의 선택된 바람직한 동결방지제(Cryoprotective agent)들은 TVEMF- 증식된 제대혈 줄기 세포들과 함께, 75에서 85% 아미노산-포도당 용액 또는 15에서 25% 폴리에틸렌 글리콜 또는 6에서 10% 텍스트란 T10, 3에서 5% 포도당, 4에서 6% 글리세롤 또는 15에서 25% 하이드록시에틸 녹말 용액 또는 60에서 80% 아미노산-포도당 용액 하의 20에서 40% 디메틸 설포사이드이다.

<94> 제대혈 세포들과 동결방지제 외에 다른 물질들이 본 발명에 존재할 수 있지만, 바람직하게는 본 발명의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물의 냉동보존은 상기 동결의 기작에 대하여 기재된 것과 같은 이유 때문에 가능한 다른 물질을 포함하지 않게 일어난다. 바람직하게는 본 발명의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물은 약 -120℃에서 약 -196℃의 온도, 바람직하게는 약 -130℃에서 약 -196℃의 온도, 더욱 바람직하게는 약 -130℃에서 약 -150℃의 온도 범위로 냉각된다.

<95> 조절된 낮은 동결 속도는 절대적이다. 여러 동결보존제들(Rapatz, G., et al., 1968, Cryobiology 5(1): 18-25) 및 여러 세포 형태들은 여러 최적 동결 온도를 가진다(예를 들어서 Rowe, A. W. and Rinfret, A. P., 1962,

Blood 20:636; Rowe, A. W., 1966, Cryobiology 3(1):12-18; Lewis, J. P., et al., 1967, Transfusion 7(1):17-32; and Mazur, P., 1970, Science 168:939-949 for effects of cooling velocity on survival of peripheral cells (and on their transplantation potential) 참조). 물이 얼음으로 변하는 동결 상의 열은 최소화되어야 한다. 그 동결 과정은 예를 들어 동결 장치 또는 메탄올 육조 과정을 사용하여 수행될 수 있다.

<96> 프로그램화된 동결 장치들은 최적 동결 속도를 결정하게 하고 표준 재생 동결을 가능하게 한다. Cryomed 또는 Planar와 같은 프로그램화된 조절된 속도 냉동기들은 그 동결 영역을 원하는 동결 속도 곡선으로 전환하게 한다. 예를 들어서 산요 Modi MDF-1155ATN-152C 및 모델 MDF-2136ATN -135C, Princeton CryoTech TEC 2000와 같은 다른 가능한 냉동기도 가능할 수 있다. 예를 들어서, 10% DMSO 및 20% 혈장 내의 CD34+/CD38- 세포들 또는 말초 혈액 세포들에서, 최적 속도는 0°C에서 -200°C에서 분당 1°C에서 3°C이다.

<97> 바람직한 실시예에서, 이 동결 속도는 본 발명의 세포들에 필요할 수 있다. 그 세포들을 포함하는 극저온 용기는 극저온에서 안정하여야 하고 냉동과 해동 모두의 효과적인 조절을 위한 신속한 열전도가 가능하여야 한다. 밀봉된 플라스틱 바이얼(예를 들어, Nunc, Wheaton cryules) 또는 유리 앰플이 복수의 작은 양들(1-2 ml)을 위하여 사용될 수 있고, 더 큰 용량들(100-200 ml)은 동결 동안에 더 좋은 열전도를 위하여 금속판 사이에 위치한 폴리올레핀 백(예를 들어, Delmed)에서 동결될 수 있다.(골수 세포의 백들은 우연하게 분 당 약 3°C의 동결 속도를 주는 -80°C 냉동기에 위치하여 성공적으로 동결된다). 또 다른 실시예에서, 동결의 메탄올 베스 방법이 사용될 수 있다. 그 메탄올 베스 방법은 큰 용량의 다수의 적은 품목의 일반적인 냉동보존에 적합하다. 그 방법은 동결 속도의 수동 조절이나 그 속도를 모니터링하는 기록기를 필요로 하지 않는다. 바람직한 측면에서, DMSO-처리된 세포들은 얼음에 미리동결하고 냉각된 메탄올을 포함하는 트레이로 옮기고 다시 기계적인 냉동고(예를 들어서, Harris 또는 Revco)에서 -130°C로 위치한다. 메탄올 베스와 그 샘플의 열전대(Thermocouple) 측정은 분당 1에서 3°C의 원하는 냉각 속도를 나타낸다. 적어도 두 시간 후, 그 샘플은 -80°C의 온도에 도달하고 장기 보존을 위하여 액체 질소(-196°C)에 직접 놓여질 수 있다.

<98> 동결 후, TVEMF-증식된 줄기 세포들은 장기 극저온 저장 용기에 신속하게 전달될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 샘플들은 액체 질소(-196°C) 또는 그것의 증기(-165°C)에서 극저온으로 보관될 수 있다. 그 저장 온도는 -120°C 이하, 바람직하게는 -130°C 이하이어야 한다. 그러한 저장은 열 누수나 질소 손실이 절대적으로 최소를 유지하는 매우 낮은 진공과 내부 초 절연을 가지는 큰 Thermos 용기 유사한 높은 효율성 액체 질소 냉동기의 이용에 의하여 크게 가능하게 되었다.

<99> 세포의 냉동보존의 바람직한 장치 및 방법은 세포를 -130°C 이하로 낮추는 그들의 과정을 이용하는 Thermogenesis Corp., Rancho Cordova, CA에 의하여 제조된 것이다. 그 세포들을 냉동 및 보관 동안에 Thermogenesis 혈장에서 유지된다. TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물의 온도를 -120°C 이하, 바람직하게는 -130°C 이하로 낮춘 후에, 그들은 Thermogenesis 냉동기와 같은 장치에서 유지될 수 있다. 그들의 온도는 약 -120°C에서 -196°C, 바람직하게는 -130°C에서 -150°C에서 유지된다. 본 발명의 냉동보존된 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물의 온도는 장기간 동안에 위해서는 약 -120°C이어서는 안 된다. 본 발명에 따른 냉동보존된 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물은 무한정의 기간 동안 냉동될 수 있고 필요한 경우에 해동될 수 있다. 예를 들어 조성물은 18년 동안까지 냉동될 수 있다. 심지어는 더 오랜 기간을 작동할 수 있고, 아마 심지어는 신생아 공여자의 수명 동안 가능할 수 있다.

<100> 필요한 경우에 세포를 가진 백들을 Thermogenesis Plasma Thawer 또는 다른 Thermoline Thawer 시리즈 장치와 같은 해동 시스템에 놓일 수 있다. 냉동보존된 조성물의 온도를는 상온까지 올린다. 동결보존제와 혼합된 세포를 해동시키는 또다른 바람직한 방법은 액체 질소에 저장된 본 발명의 냉동보존된 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물을 가진 백들을 액체 질소의 기체 상에 15분간 놓을 수 있고, 상온에서 5분간 노출하고 마지막으로 가능한 신속하게 37°C 중탕냄비(water bath)에서 해동한다. 그 해동된 백은 동일 부피의 등장염 용액 내의 5% (중량/부피) 텍스트란 40 (Solplex 40; Sifra, Verona, Italy) 및 2.5% (중량/부피) 인간 혈청 알부민으로 즉시 희석하고 그 후 400 g에서 10분간 원심분리한다. 그 상등액은 제거되고 그 침전된 세포들을 신선한 알부민/Dextran 용액으로 재부유한다. Rubinstein, P. et al., Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. Proc. Natl. Acad. Sci 92:10119-1012 (1995) for Removal of Hypertonic Cryoprotectant 참조; 세포를 해동시키는 이 바람직한 방법에 대한 변형은 Lazzari, L. et al., Evaluation of the effect of cryopreservation on ex vivo expansion of hematopoietic progenitors from cord blood. Bone Marrow Trans. 28:693-698 (2001)에서 발견된다.

<101> 세포들을 상온으로 온도를 상승시킨 후에 그들을 연구 또는 재생 치료에 이용한다. 그 해동된 TVEMF-증식된 제

대혈 줄기 세포 조성물은 포유류 바람직하게는 인간에 직접 투여될 수 있거나 또는 원하는 연구에 그 해동된 형태는 사용될 수 있다. 여러 첨가제들이 포유류 몸에 투여되기 전 바람직하게는 그러한 투여 직전에 그 해동된 조성물(또는 냉동보존되지 않은 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물)에 첨가될 수 있다. 그러한 첨가제들은 성장 인자, 구리 킬레이트제, 사이토카인, 호르몬, 적당한 버퍼 및 희석제를 포함하나 이에 한정되지 아니한다. 바람직하게는 G-CSF가 첨가된다. 심지어 더욱 바람직하게는 인간에 대하여 G-CSF는 약 20에서 약 40 micrograms/kg 체중의 용량, 심지어 더욱 바람직하게는 약 30 micrograms/kg 체중의 용량이 투여된다. 또 투여 전에, 그 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물은 포유류 자신 또는 적당한 공유자의 혈장, 혈액 또는 알부민 또는 혈액 트랜스퍼전에 관여할 수 있는 다른 물질들과 혼합될 수 있다. 그 해동된 제대혈 줄기 세포들은 예를 들어 그들을 치료에 사용될 수 있거나 또는 치료에 사용되기를 원하는 약물들에 부작용이 없는지를 알아보기 위한 테스트에 사용될 수 있다. 비록 미국에서 조직의 재생을 위하여 증식된 제대혈 줄기 세포를 사용하는 것을 FDA는 승인하지 않았지만, 그러한 승인은 임박한 것 같다. 제대혈의 수집은 출생의 짧은 기간 내에만 달성될 수 있기 때문에, 그들을 장래 용도로 수집될 것이면, 장래 연구나 가능한 장래 사용을 위하여 그들을 수집하고 증식하여야 한다. 충분한 양의 증식된 제대혈 줄기 세포들의 직접 주사는 심장, 간, 췌장, 피부, 근육, 장, 지라, 뇌 등과 같은 필수 기관들을 재생하는데 사용될 수 있어야 한다.

<102> 본 발명의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물은 조직 복구 또는 재생 또는 원하는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 충분한 양이 포유류 바람직하게는 인간에 투여되어야 한다. 바람직하게는 ml당  $10^7$ 에서  $10^9$  줄기 세포들을 가지는 적어도 20 ml의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물이 어느 치료, 바람직하게는 특히 외상이 일어나고 즉시 조직 복구가 필요한 곳에 사용된다. 이 양은 특히 75-80 kg 인간에 바람직하다. 포유류에 투여되는 조성물에서 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포의 양은 소스 제대혈 물질 내에 존재하는 세포의 수(예를 들어, 한 신생아의 제대혈에 존재하는 줄기세포들의 양)에 본질적으로 관련된다. 환자에 투여되는 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들의 바람직한 범위는 예를 들어 ml당  $10^7$ 에서  $10^9$  줄기 세포들 또는 잠재적으로 더 많은 양을 가지는 약 10 ml에서 약 50 ml의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포 조성물일 수 있다. 포유류에 투여되는 고농도의 물질이 독성 또는 심지어는 치명적일 수 있지만 모든 포유류의 제대혈 줄기 세포들, 예를 들어 적어도 7배의 TVEMF-증식을 투여하는 것이 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들에서 과용량을 야기할 것 같지는 않다. 일부 공여자로부터 유래한 제대혈이 사용되는 곳에서 포유류에 투여되는 제대혈 줄기 세포들의 수는 더 높을 수 있다. 또한 환자에 투여될 수 있는 TVEMF-세포들의 용량은 한 개인으로부터 수집되어 공급된 제대혈의 양에 의하여 제한되지 아니한다; 복수 투여, 예를 들어 1일에 1회 또는 1일에 2회 또는 일 주에 1회 또는 다른 투여 시간 골격이 용이하게 사용될 수 있다. 또한 조직이 치료되는 곳에서, 조직의 타입은 이용되는 만큼의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들의 사용을 보증할 수 있다. 예를 들어, 간은 치료하기 가장 쉽다.

<103> 상기 기재된 실시예들은 일반적으로 냉동보존 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들에 관한 것이지만, TVEMF-증식은 이미 냉동보존되고, 비증식된 또는 비-TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들의 해동 후에 일어날 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어 많은 제대혈 은행들은 만약 그러한 것이 때맞추어서 일정 시점에 필요할 때 냉동 보존 제대혈 줄기 세포들을 포함하는 냉동보존된 조성물을 가진다. 그러한 조성물들은 통상의 방법에 따라서 해동될 수 있고 여기에 기재된 것과 같은 TVEMF-과정에서의 변형을 포함하는 여기에 기재된 것과 같이 TVEMF-증식된다.

<104> 그 후 그러한 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 상기에 기재된 것과 같은 본 발명의 조성물로 간주된다. 예를 들어 만약 외상을 입었을 때 환자의 제대혈 줄기 세포들이 이미 증식되어서 제조하는 여분의 날들을 필요하지 않는 것과 같이 냉동보존 전에 TVEMF-증식이 바람직하다. 또한 바람직하지는 않지만 본 발명의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 냉동보존되고 해동되고 사용되지 않으면 다시 냉동보존된다는 것을 주목되어야 한다.

<105> 또한 본 명세서의 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 냉동보존 또는 냉동보존없이 TVEMF-증식 후에, 포유류, 바람직하게는 소스 포유류(제대혈의 공급원 포유류)에 투여될 수 있다고 이해된다.

<106> 해동된 TVEMF-증식된 제대혈 줄기 세포들은 하기의 질병들에 대한 가능한 치료의 연구에 사용될 수 있다:

<107> I. 특발성, 감염, 방사선 또는 약물에 기인한 블랙판-다이아몬드 증후군, 적혈구 무혈성증, 혈소판감소증, 범혈구 감소증, 재생불량성 빈혈, 과증식성 줄기세포 이상, 정상적인 혈액 세포 생성 및 성숙의 실패 또는 부전의 결과로 생긴 질병;

<108> II. 조혈악성종양, 급성 림프성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 악성 척수경화증(myelosclerosis), 다발성골수종, 진성적혈구증가증, 원인불명성 골수화생, 발데스트롬스 매크로글로불린혈증, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종;

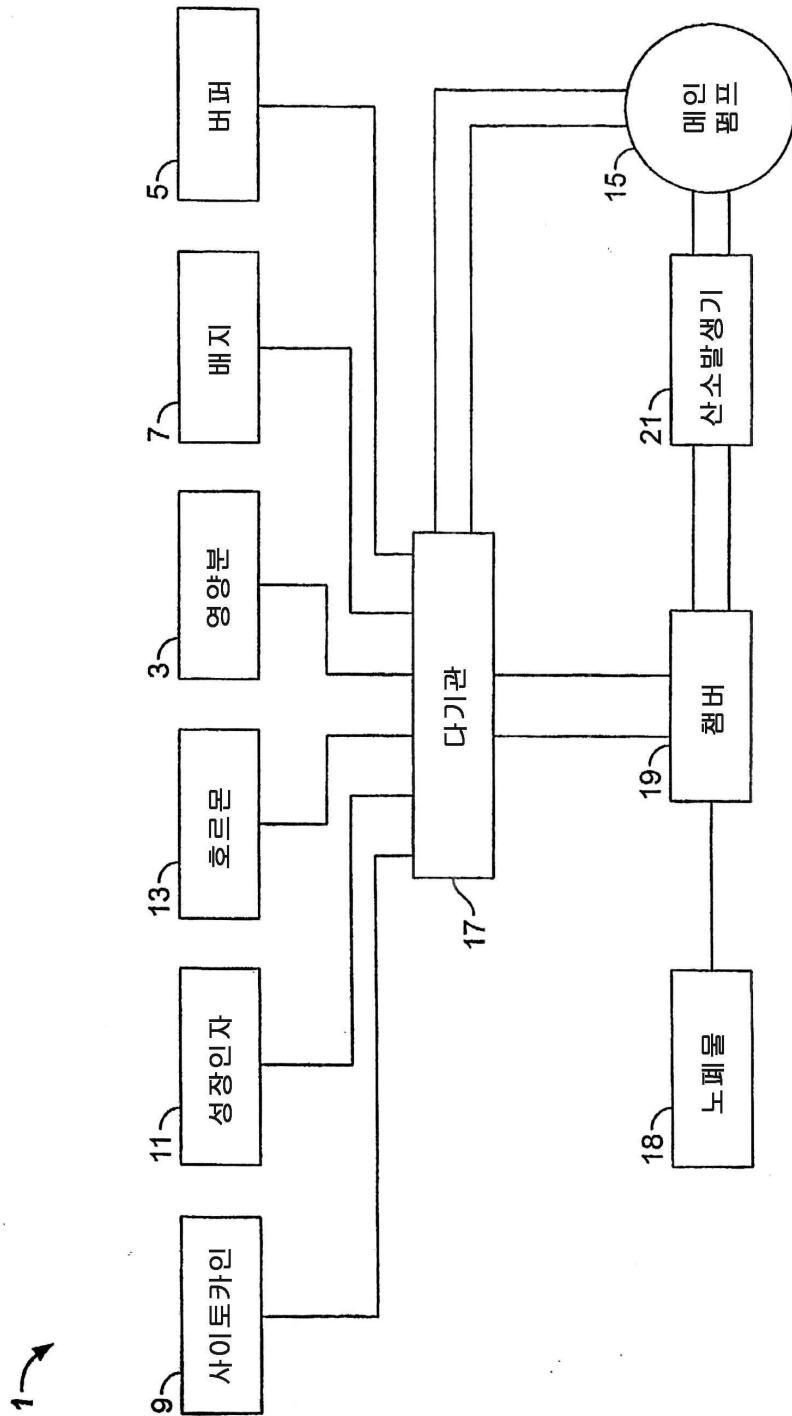
- <109> III. 악성, 고형 종양, 악성 흑색종, 위암, 난소암, 유방암, 소 세포성 폐암, 망막아중, 고환암, 교아세포종, 횡문근육종, 신경아세포종, 유잉 육종, 림프종을 갖는 환자에서 면역억제;
- <110> IV. 자가면역 질환들, 루마티스성 관절염, 타입 I 당뇨병, 만성 간염, 다발성 경화증, 및 전신성 홍반성 루푸스;
- <111> V. 유전성(선천성) 이상들, 빈혈, 가족성 재생불량성(aplastic), 판코니 증후군, 블룸 증후군, 순수적혈구 무형성증(PRCA), 선천성 각화이상증, 블랙판-다이아몬드 증후군, 선천성 적혈구생성이상(dyserythropoietic) 증후군 I-IV, 추아크만(Chwachmann)-다이아몬드 증후군, 디하이드로폴레이트 리덕테이즈 결핍, 포름아미노 트랜스퍼레이즈 결핍, 레쉬나이한 증후군, 선천성 구상적혈구증, 선천성 타원적혈구증, 선천성 유구적혈구증(stomatocytosis), 선천성 Rh 널(null) 질환, 발작성 약간 혈색소뇨증, G6PD(포도당-6-인산 탈수소효소), 변이체 1,2,3, 피루베이트 카이네이즈 결핍, 선천성 에리트로포이에틴 민감성, 결핍, 겸상적혈구 질환 및 형질, 탈라세미아 알파, 베타, 감마 메트헤모글로빈혈증, 면역계의 선천성 이상들, 중증합병 면역 결핍증(SCID), 빈(bare) 림프구 증후군, 이오노포어-반응성 합병 면역결핍증, 캡핑 이상(capping abnormality)을 가지는 합병 면역결핍, 뉴크레오사이드 포스포리레이즈 결핍, 과립구 액틴 결핍, 유아성 유전의 무과립세포증, 고세병, 아데노신 디아미네이즈 결핍, 코스트만 증후군, 망상 발육부전(reticular dysgenesis), 선천성 백혈구 부전 증후군; 및
- <112> VI. 골화석증, 척수경화증, 후천성 용혈성 빈혈, 후천성 면역결핍증, 1차 또는 2차 면역결핍을 야기하는 감염 질환들, 박테리아 감염(예를 들어, 브루셀라병, 리스테리아증, 결핵, 나병), 기생충 감염(예를 들어, 말라리아, 리슈마니아증), 진균류 감염, 노화 식세포 이상에 기인한 손상된 면역 기능 및 림프 세포 세트의 불균형에 관여하는 이상, 코스트만 무과립구증, 만성 육아종성 질환, 체디아크-히가시 증후군, 호중구 액틴 결핍, 호중구 막 GP-180 결핍, 대사 저장 질환, 뮤코다당증, 뮤코지질증, 면역 기작과 관련된 기타 이상들, 위스코트-알드리치 증후군, 알파 1-항트립신 결핍.
- <113> 본 발명의 제대혈 줄기 세포들의 증식, 보존 및 해동의 전 과정 동안 그들의 3차원 형태 및 세포-세포 서포트 및 세포-세포 형태는 유지된다.
- <114> 바람직한 실시예들을 여기에 기재하였지만 당업자들은 다양한 변화 및 변형들을 본 발명이 포함한다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 범위는 상기 기재된 실시예에 한정되지 아니한다.

**도면의 간단한 설명**

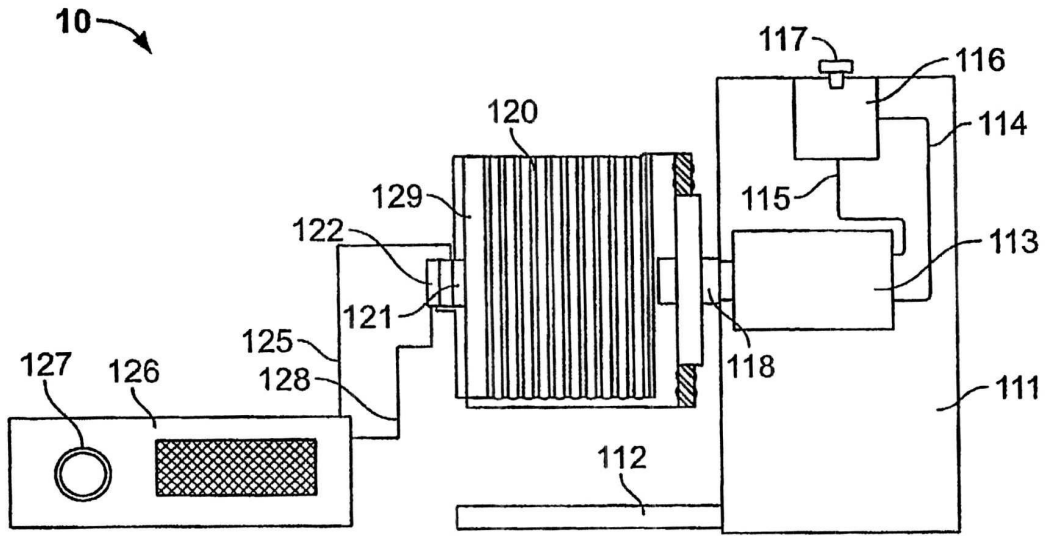
- <65> 도 1은 생물반응장치의 배양 캐리어 후로우 루프의 바람직한 실시예를 도식적으로 설명하는 것이다;
- <66> 도 2는 본 발명의 TVEMF- 생물반응장치의 바람직한 실시예의 입면도(elevated side) 이다;
- <67> 도 3은 도 2의 TVEMF- 생물반응장치 의 바람직한 실시예의 투시(perspective)도;
- <68> 도 4는 TVEMF- 생물반응장치의 바람직한 실시예의 수직 단면도(vertical cross sectional view);
- <69> 도 5는 TVEMF- 생물반응장치의 수직 단면도(vertical cross sectional view);
- <70> 도 6은 생물반응장치에게 공간을 제공하고, 생물반응장치에 시변전자기력을 제공할 수 있는 시변(time varying) 전자기력 장치의 입면도;
- <71> 도 7은 도 6에 기재된 장치의 정면도; 및
- <72> 도 8은 그 안에 생물반응장치를 더욱 나타내는 도 6에 나타낸 장치의 정면도이다.

도면

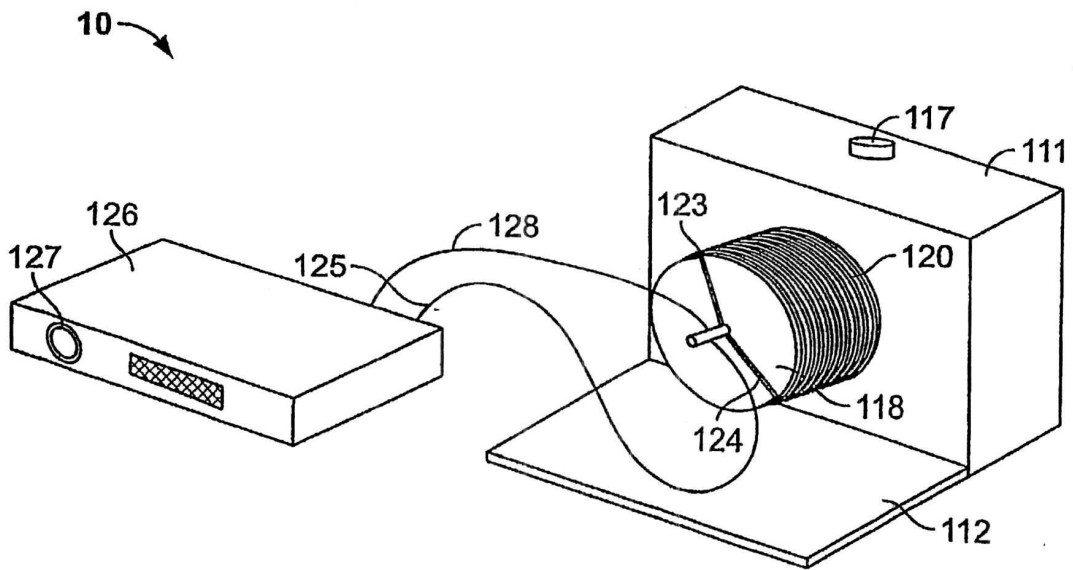
도면1



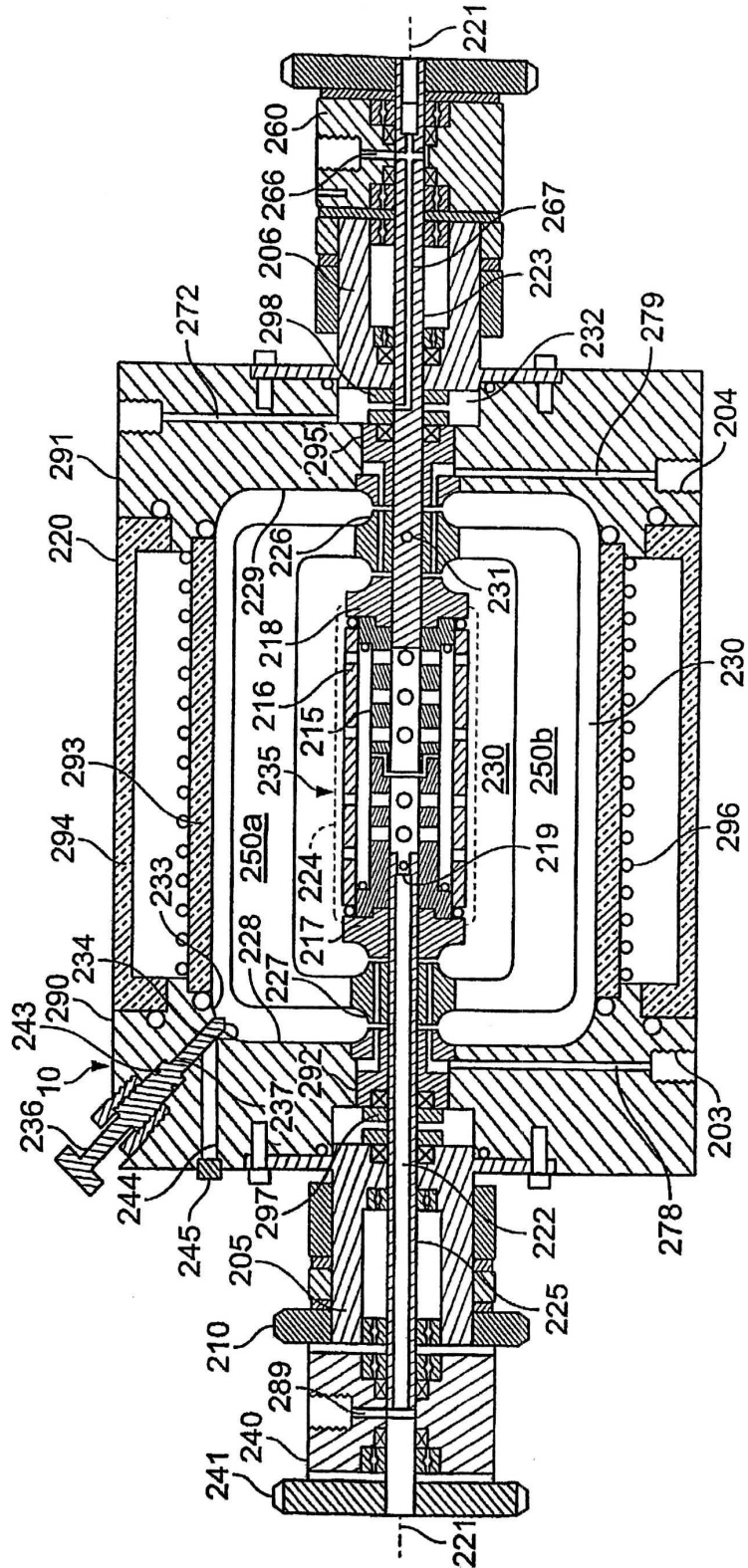
도면2



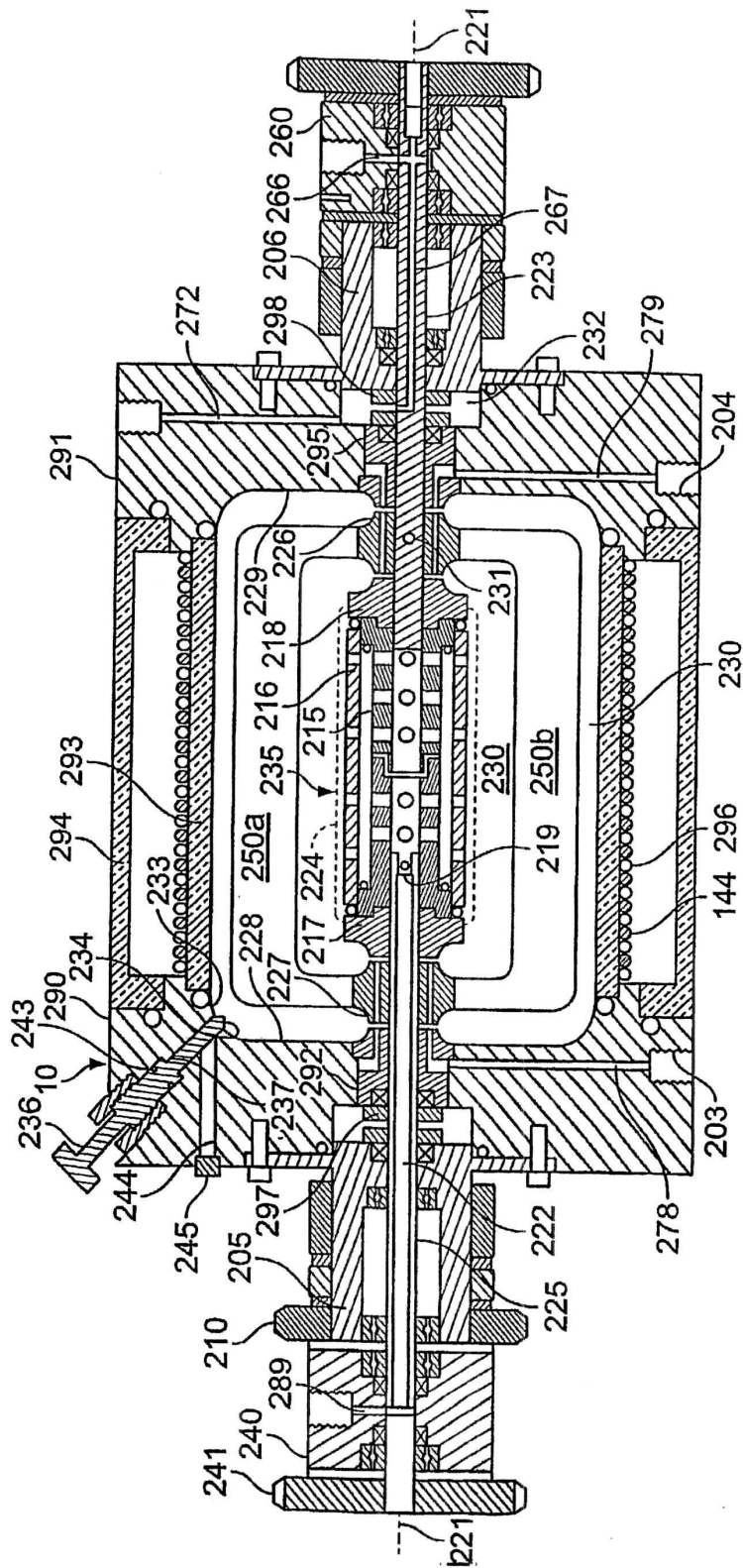
도면3



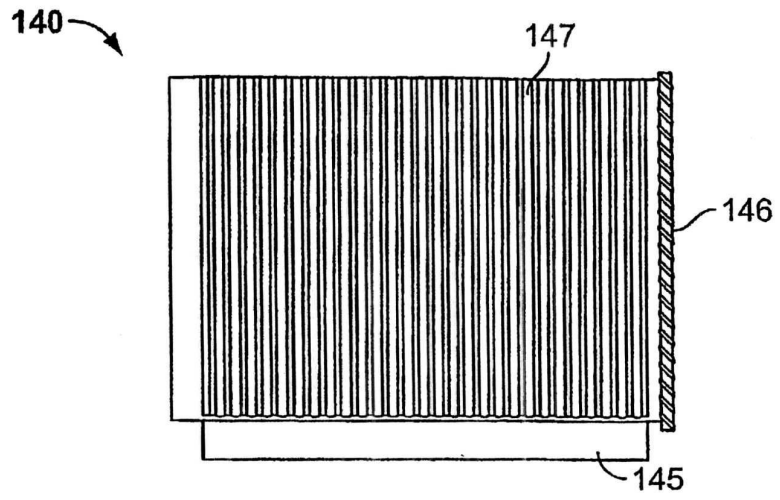
도면4



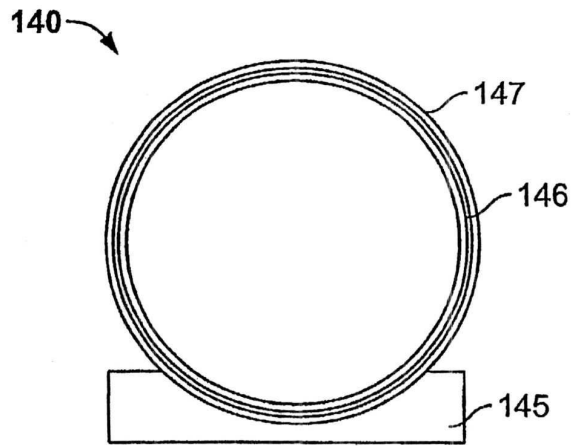
도면5



도면6



도면7



도면8

