(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0043517
(43) 공개일자 2020년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0692 (2013.01)
C12N 5/0691 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7011050(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년09월26일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7012717
원출원일자(국제) 2008년09월26일
심사청구일자 2019년05월31일
(85) 번역문제출일자 2020년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/011167
(87) 국제공개번호 WO 2009/042201
국제공개일자 2009년04월02일
(30) 우선권주장
60/995,679 2007년09월26일 미국(US)

(71) 출원인
안트로제네시스 코포레이션
미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
(72) 발명자
창, 샤오쿠이
미국 07039 뉴저지주 리빙스톤 마운트헤븐 드라이브 10
헤이다란, 모하마드, 에이.
미국 07928 뉴저지주 차탐 오르몬트 드라이브 88
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이귀동

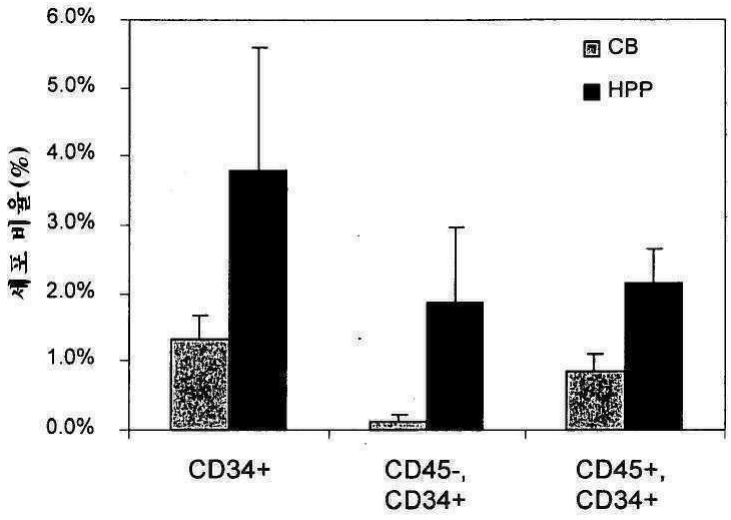
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **인간 태반 관류액으로부터의 혈관형성 세포**

(57) 요 약

본원에서는 태반 관류액으로부터의 혈관성 또는 혈관형성 세포 생산을 제공한다. 또한, 본원에서는 심장 또는 혈관 기능부족, 질환, 질병 또는 병태를 앓는 개체에게 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 또는 태반 또는 비-태반 조혈 줄기 세포 또는 부착성 태반 줄기 세포와 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는, 심장 또는 혈관 기능부족, 질환, 질병 또는 병태를 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2501/70 (2013.01)
(72) 발명자
보스키나리안-버스, 바네사, 에이.
미국 07940 뉴저지주 메디슨 넘버1 그린우드 에비뉴 57
캉, 린
미국 08820 뉴저지주 에디슨 팀버 오크스 로드 1106
바리간, 헨리, 렌돈
미국 07643 뉴저지주 리틀 페리 메인 스트리트 335

명 세 서

청구범위

청구항 1

$CD34^+$ 인간 태반 관류액 세포를 개체에서 혈관형성을 촉진시키기에 충분한 양으로 포함하는, 개체에서 혈관형성을 촉진시키기 위한 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 개체가 심장 또는 혈관의 기능부족(insufficiency) 또는 결손(defect)을 앓고 있는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 심장 또는 혈관의 기능부족 또는 결손이 말초 혈관 질환, 급성 또는 만성 심근경색증, 심근병증, 울혈성 또는 만성 심부전, 심혈관 허혈, 고혈압성 폐 혈관 질환, 말초 동맥 질환, 또는 류마티스 심장병과 연관된 기능부족 또는 결손인 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 개체가 뼈 결손을 앓고 있는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 태반 관류액 세포가 단일의 태반 관류로부터 단리된 인간 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 태반 관류액으로부터 단리된 것 이외의 단리된 $CD34^+$ 세포를 추가로 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 태반 관류액으로부터 단리된 것 이외의 $CD34^+$ 세포가 태반으로부터 단리된 것인 약제학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 태반 관류액으로부터 단리된 것 이외의 $CD34^+$ 세포가 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 골수로부터 단리된 것인 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 $CD34^+$ 인간 태반 관류액 세포가 제대혈로부터 수득된 같은 개수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 $CD34^+$ 인간 태반 관류액 세포 및/또는 태반 관류액으로부터 단리된 것 이외의 $CD34^+$ 세포가 $CD34^+CD45^-$ 세포인 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 인간 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포를 포함하는 것인 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 1. 기술분야

[0002] 본원에서는 단리된 태반 관류액, 태반 관류액 세포 군집, 상기 관류액 또는 관류액 세포를 포함하는 조성물, 및 혈관형성 세포 및 혈관형성 세포 군집을 생산하기 위해, 그리고 심장 또는 혈관 질환, 질병 또는 기능부족을 앓는 개체를 치료하기 위해 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 사용하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0003] 2. 배경기술

[0004] 인간 줄기 세포는 다양한 성숙형 인간 세포 계통을 생성할 수 있는 전능성(totipotential) 또는 다능성(pluripotential) 전구 세포이다. 전부는 아니여도 다수의 조직을 재증식시키고 생리적 및 해부학적 기능성을 복원하는데 줄기 세포가 사용될 수 있다는 것을 입증하는 증거가 존재한다.

[0005] 많은 다른 유형의 포유동물 줄기 세포들의 특징이 규명되었다. 예를 들어, (미국 특허 번호 제5,486,359호 (캐플런(Caplan) 등) (인간 중간엽 줄기 세포); 미국 특허 번호 제5,004,681호 (보이세(Boyse) 등) (태아 및 신생아 조혈 줄기 세포 및 기원 세포); 미국 제5,192,553호 (보이세 등) (동일); [Beltrami et al., *Cell* 114(6):763-766 (2003)] (심장 줄기 세포); [Forbes et al., *J. Pathol.* 197(4):510-518 (2002)] (간 줄기 세포))를 참조한다. 제대혈, 및 제대혈로부터 유래된 전체 유핵 세포가 절제 치료법을 받은 환자에서 조혈 기능을 부분적으로 또는 완전히 복원하기 위해 이식에서 사용되었다. 태반 관류액은 태반 혈관계를 통해 관류 용액을 통과시킴으로써 수득한 태반 세포 수집물, 및 상기 혈관계로부터, 태반의 모체 측면으로부터, 또는 그 둘 모두로부터의 관류 유체 수집물을 포함한다. 포유동물 태반을 관류시키는 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 제7,045,146호 및 미국 특허 번호 제7,255,879호에 기재되어 있다. 관류에 의해 수득된 태반 세포 군집은 이종성을 띠며, 이는 특히, $CD34^+$ 세포, 유핵 세포, 예로서, 과립구, 단핵구 및 대식세포, 작은 비율의 (1% 미만) 조직 배양 기판-부착성 태반 줄기 세포를 포함한다. 현재까지는 혈관형성 세포 생산에 있어서 태반 관류액이나, 관류액으로부터의 태반 세포 군집을 사용하는 것에 관해 기술된 바 없었다.

발명의 내용

[0006] 3. 요약

[0007] 본원에서는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포로부터 혈관형성 또는 혈관성 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

[0008] 하나의 측면에서, 본원에서는 다수의 태반 관류액 세포가 혈관계 또는 심장계 세포로, 예를 들어, 혈관 세포, 예를 들어, 내피 세포로, 또는 심장 세포로 분화할 수 있는 조건하에서 태반 관류액 또는 관류액 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 혈관형성 또는 혈관성 세포, 예를 들어, 혈관계를 형성할 수 있는 능력을 가진 혈관형성 또는 혈관성 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 상기 태반 관류액 세포는 조혈 태반 줄기 세포, 예를 들어, $CD34^+$ 태반 세포를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "$CD34^+$ 태반 세포"라는 용어는 태반 혈액이나 제대혈이 아닌, 태반으로부터 수득된 $CD34^+$ 세포, 예를 들어, 내피 기원 세포를 지칭한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포, 예를 들어, 상기 $CD34^+$ 태반 줄기 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준의 양으로 하나 이상의 혈관형성-관련 마커를 생산한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 마커로는 CD31, VEGF-R 및/또는 CXCR4를 포함한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 $CD34^+$ 세포는 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$,$CD45^-$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준의 양으로 하나 이상의 혈관형성-관련 마커를 생산한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 마커는 CD31, VEGF-R 및/또는 CXCR4를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서,

상기 배양은 상기 관류액 세포, 예를 들어, 상기 $CD34^+$ 태반 세포를 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-β), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 플라스미노겐, 조직 플라스미노겐 활성 인자 (tPA) 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제와 접촉시키는 것을 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 배양은 18-24시간 동안 이루어진다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는, 상기 접촉 후 24시간이 경과한 후에 보이는 혈관 구조를 형성한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는 24시간이 경과한 후에 보이는 혈관 구조를 형성하되, 제대혈로부터의 $CD34^+$ 줄기 세포는 보이는 혈관 구조를 형성하지 못하거나, 검출가능하게는 상기 관류액 세포 또는 $CD34^+$ 태반 세포보다 더 적은 혈관 구조를 형성하는 것인 조건하에서 상기 접촉이 이루어진다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 시험관내에서 실시된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 생체내에서 실시된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 생체내 접촉은 포유동물에서 실시된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 포유동물은 인간이다. 특정 실시태양에서, 본원에 기술된 $CD34^+$ 세포 중 임의의 것, 또는 $CD34^+$ 세포 군집은 확장된다.

[0009] 특정 실시태양에서, 본원에서는 태반 관류액 세포 군집을, 혈관 형성을 촉진시키는 조건과 접촉시키는 단계를 포함하는, 태반 관류액 세포 군집으로부터 혈관을 형성하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 시험관내에서 실시된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 생체내에서 실시된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 단일의 태반 관류로부터 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+CD45^-$ 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포 또는 $CD34^+CD45^-$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR 중 적어도 하나를 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 상기 관류액으로부터 단리된 것이 아닌 (예를 들면, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 골수 등으로부터 단리된) 단리된 $CD34^+$ 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 태반으로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 골수로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+$, $CD45^-$ 세포이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$, $CD45^-$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다.

[0010] 또다른 측면에서, 본원에서는 심장 또는 혈관 기능부족의 하나 이상의 증상을 검출가능할 정도로 개선시키거나, 또는 상기 증상 악화를 감소시키는데 충분한 양으로 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 심장 또는 혈관 기능부족 또는 결손을 앓는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 예를 들어, 상기 개체에서 혈관형성 또는 혈관형성을 촉진시킴으로써 심장 또는 혈관 기능부족 또는 결손을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 삽입형 또는 주사용 조성물에 포함되어 있다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 본원에서 제공하는 조성물에 포함되어 있다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 다수의 $CD34^+$ 태반 세포, 부착성 태반 세포, 또는 그 둘 모두로 보충된다.

[0011] 또다른 실시태양에서, 본원에서는 심장 또는 혈관 질환, 질병, 병태 또는 기능부족을 치료하는데 충분한 양으로 인간 태반 관류액 세포를 상기 질환, 질병, 병태 또는 기능부족을 앓는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심장 또는 혈관 질환, 질병, 병태 또는 기능부족을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 질환, 질병, 병태 또는 기능부족은 말초 혈관 질환, 급성 또는 만성 심근경색증, 심근병증, 울혈성 또는 만성 심부전, 심혈관 허혈, 고혈압성 폐 혈관 질환, 말초 동맥 질환, 또는 류마티스 심장병이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 단일의 태반 관류로부터 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+CD45^-$ 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포 또는 $CD34^+CD45^-$ 세포는, 제

대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR 중 적어도 하나를 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 상기 관류액으로부터 단리된 것 이외의, 단리된 $CD34^+$ 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 태반으로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 골수로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD45^-$이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포, 또는 상기 $CD34^+CD45^-$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 스캐폴드 또는 매트릭스 상에 존재하는 상태로 투여된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 정맥내로 투여된다.

[0012] 상기 방법의 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 태반 세포는 태반 관류액으로부터 단리된 것, 예를 들면, 태반 관류액 세포로부터 단리된 것이다. 특정 실시태양에서, 세포는 $CD44^-$이다. 특정 실시태양에서, 세포는 $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, 또는 $CD166^+$이다. 특정 실시태양에서, 세포는 $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, 및 $CD166^+$이다. 특정 실시태양에서, 세포는 $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, 또는 $CD200^+$이다. 특정 실시태양에서, 세포는 $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, 및 $CD200^+$이다. 특정 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+CD45^-$ 세포이다. 특정의 다른 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다.

[0013] 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 조합된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 태반 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 태반 내피 기원 세포이다. 다른 구체적인 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 조혈 세포, 예를 들어, 태반 $CD34^+$ 조혈 줄기 세포이다. 구체적인 실시태양에서, 조혈 세포 대 태반 관류액 세포의 비는 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등이다. 특정의 다른 실시태양에서, 태반 이외의 공급원으로부터의 (예를 들어, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 골수 등으로부터의) $CD34^+$ 세포는 $CD34^+$ 태반 세포와 조합된다. 구체적인 실시태양에서, 비-태반 $CD34^+$ 세포 대 $CD34^+$ 태반 세포의 비는 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등이다.

[0014] 특정 실시태양에서, 태반 관류액은 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 줄기 세포를 포함한다. 부착성 줄기 세포는 미국 특허 번호 제7,045,148호; 제7,255,879호; 제7,311,904호; 및 제7,311,905호; 및 미국 출원 공개 번호 제2007/0275362호 및 제2008/0032401호 (상기 개시 내용의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있는 세포이다. 부착성 태반 줄기 세포는 줄기 세포의 특징들을 하나 이상 나타내며 (예를 들어, 줄기 세포와 관련된 마커를 나타내고, 미분화 상태하에서는 배양물 중에서 적어도 10-20회에 걸쳐 복제를 하며, 3개의 배엽층을 나타내는 성체 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 등의 특징을 나타내며), 조직 배양 기판 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱, 예로서, 조직 배양 접시 또는 다중웰 플레이트 표면)에 부착될 수 있다.

[0015] 하나의 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD200^+$ 또는 $HLA\text{-}G^+$이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는 $CD200^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 및

CD105^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는, 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 상기 군집으로부터의 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다.

[0016] 또다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 CD73^{+}, CD105^{+}, 및 CD200^{+}이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 HLA-G^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 또는 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 및 CD45^{-}이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-}, CD45^{-}, 및 HLA-G^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는, 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 상기 군집으로부터의 하나 이상의 배양체-유사체의 발생을 촉진시킨다.

[0017] 또다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 CD200^{+} 및 OCT-4^{+}이다. 구체적인 실시태양에서, 줄기 세포는 CD73^{+} 및 CD105^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 HLA-G^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 또는 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 및 CD45^{-}이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-}, CD45^{-}, CD73^{+}, CD105^{+} 및 HLA-G^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는, 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 상기 군집으로부터의 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다.

[0018] 또다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 CD73^{+} 및 CD105^{+}이고, 상기 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 상기 군집에서 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 또는 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 및 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 OCT4^{+}이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 OCT4^{+}, CD34^{-}, CD38^{-} 및 CD45^{-}이다.

[0019] 또다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 CD73^{+}, CD105^{+} 및 HLA-G^{+}이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 또는 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-} 및 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD200^{+}이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-}, CD45^{-}, OCT-4^{+} 및 CD200^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는, 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 상기 군집으로부터의 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다.

[0020] 또다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 OCT-4^{+}이고, 상기 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 상기 군집에서 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD73^{+} 및 CD105^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-}, 또는 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD200^{+}이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD73^{+}, CD105^{+}, CD200^{+}, CD34^{-}, CD38^{-}, 및 CD45^{-}이다.

[0021] 또다른 실시태양에서, 관류액 또는 관류액 세포는 제대혈이 배수되고 나머지 혈액을 제거하도록 관류된 포유동물 태반을 관류시키는 단계; 상기 태반을 관류 용액으로 관류시키는 단계; 및 상기 관류 용액을 수집하되, 여기서, 관류 후의 상기 관류 용액은 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포 군집을 포함하는 것인 단계; 및 상기 세포 군집으로부터 다수의 상기 태반 줄기 세포를 단리시키는 단계를 포함하는 방법에 따라 생산된, 본원에 기술된 단리된 태반 줄기 세포 군집을 포함한다. 구체적인 실시태양에서, 관류 용액은 배꼽 정맥 및 배꼽 동맥, 둘 모두를 통과하게 되고, 태반으로부터 삼출된 후 수집된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 관류 용액은 배꼽

정맥을 통과하게 되고, 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 배꼽 동맥을 통과하게 되고, 배꼽 정맥으로부터 수집된다.

[0022] 더욱 구체적인 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, 및 ZC3H12A로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를, 태반 줄기 세포에 진행된 계대수와 동등한 계대수의 배양이 진행된 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다.

[0023] 또한 본원에서는 태반 관류액 또는 관류액 세포를 포함하는, 조성물, 예를 들어, 약제학적 조성물의 용도를 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 다수의 $CD34^+$ 태반 세포 및/또는 부착성 태반 줄기 세포로 보충된다. 구체적인 실시태양에서, 조성물은 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와, 상기 관류액 또는 관류액 세포로부터의 혈관 또는 혈관-유사 구조 형성을 유도하는 하나 이상의 제제를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 제제로는 TGF-β, FGF, 플라스미노겐, tPA, 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제를 포함한다.

[0024] 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 조성물 중 임의의 것은 매트릭스를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 매트릭스는 3차원 스캐폴드이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 매트릭스는 콜라겐, 젤라틴, 라미닌, 피브로넥틴, 펙틴, 오르니틴, 또는 비트로넥틴을 포함한다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 매트릭스는 양막 또는 양막-유래 생체물질이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 매트릭스는 세포외막 단백질을 포함한다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 매트릭스는 합성 화합물을 포함한다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 매트릭스는 생체활성 화합물을 포함한다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 생체활성 화합물은 성장 인자, 사이토카인, 항체, 또는 5,000 달톤 미만의 유기 분자이다. 특정 실시태양에서, 매트릭스는 분해가능한 합성 중합체, 예로서, 폴리락트산 또는 폴리글리콜산이다. 특정 실시태양에서, 매트릭스 는 삽입형 스캐폴딩 기판이다. 특정 실시태양에서, 삽입형 스캐폴딩 기판은 콜라겐 기판 또는 하이알루론산 기판이다. 특정 실시태양에서, 삽입형 스캐폴딩 기판은 콜라겐 기판이다.

[0025] 추가의 또다른 측면에서, 본원에서는 태반 관류액 또는 관류액 세포를 삽입형 스캐폴딩 기판과 조합하는 단계를 포함하는, 매트릭스를 제조하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 줄기 세포는 비부착성이다. 특정 실시태양에서, 줄기 세포는 $CD34^+$이다. 또다른 측면에서, 본원에서는 태반 관류액 또는 관류액 세포를 주사용 하이알루론산 또는 콜라겐과 조합하는 단계를 포함하는, 주사용 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 줄기 세포는 비부착성이다. 특정 실시태양에서, 줄기 세포는 $CD34^+$이다.

[0026] 특정 실시태양에서, 태반 관류액 세포, 또는 태반 관류액 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어, 약제학적 조성물은 용기에 포함되어 있다. 하나의 실시태양에서, 용기는 액체를 정맥내로 전달하기에 적합한 백이다. 특정 실시태양에서, 용기는 적어도, 약, 또는 최대 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 또는 1×10^{10}개의 세포, 예를 들어, 태반 관류액 세포, 다수의 $CD34^+$ 태반 세포 (예를 들어, $CD34^+$ 태반 내피 기원 세포)로 보충된 태반 관류액 세포, 또는 부착성 태반 줄기 세포로 보충된 태반 관류액 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 용기는 상기 줄기 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 세포는 최대 5회, 10회, 또는 20회 계대되었다. 특정 실시태양에서, 상기 세포는 상기 용기 내에서 확장되었다. 특정 실시태양에서, 상기 용기 중의 상기 세포는 0.9% NaCl 용액 중에 포함되어 있다.

[0027] 또다른 측면에서, 본원에서는 줄기 세포를 포함하는 태반 관류액 또는 관류액 세포를 삽입형 스캐폴딩 기판과 조합하는 단계를 포함하는, 매트릭스를 제조하는 방법을 제공한다. 특정의 다른 실시태양에서, 본원에서는 $CD34^+$ 태반 세포인 줄기 세포의 군집을 주사용 하이알루론산 또는 콜라겐과 조합하는 단계를 포함하는, 주사용 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 특정 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 태반 관류액 세포내 포함되어 있다. 특정 실시태양에서, 조성물은 주사용 하이알루론산을 포함한다. 특정 실시태양에서, 조성물은 주사용 콜라겐을 포함한다.

[0028] 추가로 본원에서는 본원에서 제공하는 조성물 및 방법에서의 냉동보존된 태반 관류액 또는 관류액 세포의 용도를 제공한다.

[0029] 3.1 정의

[0030] 본원에서 사용되는 바, 용어 "SH2"는 마커 CD105 상의 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 따라서, $SH2^+$로 지칭되는 세포는 $CD105^+$이다.

[0031] 본원에서 사용되는 바, 용어 "SH3" 및 SH4"는 마커 CD73 상에 존재하는 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 따라서, $SH3^+$ 및/또는 $SH4^+$로 지칭되는 세포는 $CD73^+$이다.

[0032] 본원에서 사용되는 바, 용어 "단리된 줄기 세포"는 줄기 세포가 유래되는 조직, 예를 들어, 태반의 다른 비-줄기 세포로부터 실질적으로 분리된 줄기 세포를 의미한다. 줄기 세포와 천연적으로 회합된 비-줄기 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가, 예를 들어, 줄기 세포의 수집 및/또는 배양 동안, 줄기 세포로부터 제거된 경우라면, 줄기 세포는 "단리"된 것이다.

[0033] 본원에서 사용되는 바, 용어 "단리된 세포 군집"은 세포 군집이 유래되는 조직, 예를 들어, 태반의 다른 세포로부터 실질적으로 분리된 세포 군집을 의미한다. 세포 군집 또는 세포 군집이 유래된 세포와 천연적으로 회합된 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가, 예를 들어, 줄기 세포의 수집 및/또는 배양 동안, 줄기 세포로부터 제거된 경우라면, 줄기 세포는 "단리"된 것이다.

[0034] 본원에서 사용되는 바, "태반 관류액"은 태반, 예를 들어, 인간 태반의 적어도 일부를 통해, 예로서, 태반 혈관계를 통해 통과한 관류 용액으로서, 태반을 통해 통과하는 동안 관류 용액에 의해 수집되어진 다수의 세포를 포함하는 관류 용액을 의미한다.

[0035] 본원에서 사용되는 바, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 단리되었거나, 그로부터 단리될 수 있는 유핵 세포, 예를 들어, 전체 유핵 세포를 의미한다.

[0036] 본원에서 사용되는 바, 용어 "태반 줄기 세포"는 형태, 세포 표면 마커, 또는 1차 배양 후의 계대수와는 상관없이, 포유동물 태반으로부터 유래된 줄기 세포 또는 기원 세포를 지칭한다. 그러나, 본원에서 사용되는 바, 용어 "태반 줄기 세포"는 영양막(trophoblast)을 지칭하지는 않는다. 세포가 줄기 세포의 속성을 적어도 하나 보유하는 경우, 예를 들어, 하나 이상의 유형의 줄기 세포와 관련된 마커 또는 유전자 발현 프로파일; 배양물 중에서 적어도 10-40회 복제할 수 있는 능력, 3가지 배엽층 모두의 세포로 분화할 수 있는 능력; 성체 (즉, 분화된) 세포 특징의 결여 등을 보유하는 경우에 세포는 "줄기 세포"로 간주된다. 용어 "태반 줄기 세포" 및 "태반-유래 줄기 세포"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0037] 본원에서 사용되는 바, 줄기 세포는 특정 마커가 검출가능할 경우, 상기 마커에 대하여 "양성"을 띤다. 예를 들면, 태반 줄기 세포는, 예를 들어, CD73에 대해 양성인데, 이는 CD73이 태반 줄기 세포 상에서 배경 (예를 들어, 이소형 대조군과 비교하여)보다 검출가능하게 더 큰 양으로 검출될 수 있기 때문이다. 마커가 세포를 적어도 하나의 기타 다른 세포 유형으로부터 구별하는데 사용될 수 있거나, 또는 세포에 의해 발현되거나 존재할 때 세포를 선별 또는 단리시키는데 사용될 수 있는 경우, 세포는 이러한 마커에 대해서도 양성을 띤다.

[0038] 본원에서 사용되는 바, "매트릭스"는 공극이 물질 전역에 걸쳐 분산되어 있는 것을 특징으로 하는 3차원 물질을 지칭한다. 공극은 예를 들면, 매트릭스 내에서 세포, 예를 들어, 줄기 세포, PDAC, 및/또는 골발생성 세포를 성장시키는데 적합하다. 매트릭스의 예로는 β-삼인산칼슘 기판, β-삼인산칼슘-콜라겐 기판, 콜라겐 기판, 인산칼슘 기판, 무기질화된 인간 태반 콜라겐 기판, 하이알루론산 기판, 및 세라믹 기판을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게, 매트릭스는 매트릭스의 공극내 존재하는 골발생성 세포에 의해 무기질화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 4. 도면의 간단한 설명

도 1은 제대혈 (CB) 또는 인간 태반 관류액 (HPP) 중 CD34 및/또는 CD45를 발현하는 유핵 관류액 세포의 비율을 도시한다.

도 2는 제대혈 (CB) 또는 인간 태반 관류액 (HPP)으로부터 수득된, CD31, CXCR4 및/또는 VEGFR을 발현하는 $CD34^+$ 세포의 비율을 도시한다.

도 3은 HPP $CD34^+CD45^-$ 및 $CD34^+CD45^+$ 세포에서 실시된 qRT-PCR에 의한 유전자 발현 분석 결과를 도시한다. 인

간 태반 관류액 $CD34^+$, $CD45^-$ 및 $CD34^+$, $CD45^+$ 세포 중의 CD34 및 CD45의 상대적인 발현값은 제대혈로부터 수득된 $CD34^+$ 세포 중의 CD34 및 CD45의 발현값으로 정규화된 값이다. 상대적인 정량값 (RQ) (Y축)은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$으로 제시한다.

도 4는 길즈 변형된 헤마톡 실린(Gill's Modified Hematoxylin) 염료로 염색된 CFU-Hill 콜로니 (배율 200X)를 도시한다. 콜로니는 엔도컬트(ENDOCULT)® 배지에서 2주 동안 배양된 인간 태반 관류액 세포 배양물로부터 발생하였다.

도 5는 96-웰 플레이트의 각 웰당 10^6개의 세포로 EC매트릭스 상에서 18-24시간 동안 배양된 HPP 세포에 의한 혈관 형성을 도시한다. 배율 200X.

도 6은 HPP에 의한 생체내 골 형성 활성을 도시한다.

도 7A, 7B는 이식 후 21일 경과시에 스캐폴드 중심부를 촬영한 영상이다. (A) 비토스(Vitoss) 및 HPP 세포 (B) 세포를 포함하지 않는 비토스. 도 6A에 나타난 바와 같이, 다수의 CD34 양성 세포 (화살표로 표시)는 혈관 인접부에서 관찰할 수 있다. 원래 배율 200X, 축적 막대 100 ㎛; 원 색상: aSMA 적색 (AF594), CD34 녹색 (플루오레세인).

도 8A, 8B는 이식 후 42일 경과시에 스캐폴드 중심부를 촬영한 영상이다. (A) 비토스 및 HPP 세포 (B) 세포를 포함하지 않는 비토스. 도 7A에 나타난 바와 같이, CD34 양성 세포 (화살표로 표시)는 혈관 인접부에서 관찰할 수 없다. 원래 배율 200X, 축적 막대 100 um, aSMA 적색 (AF594).

도 9는 21일째에 두 동물군에서, HPP 세포의 사용으로 혈관형성이 통계학상 유의적으로 증강되었음을 나타내는 영상 분석 결과이다. Y축 - 알파 평활근 액틴 발현율(%).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] **5.** 상세한 설명

[0041] **5.1** 태반 관류액을 사용한 치료 방법

[0042] 본원에서는 태반 관류액으로부터 혈관성 또는 혈관형성 세포를 생산하는 방법, 및 심장 또는 혈관 기능부족, 질환, 질병 또는 병태를 앓는 개체의 치료에 있어서, 단독으로 또는 $CD34^+$ 태반 세포 (예를 들어, $CD34^+$ 태반 내피 기원 세포) 및 부착성 태반 줄기 세포, 예를 들어, 하기 섹션 5.3에 기술되는 부착성 태반 줄기 세포와 함께 조합된, 상기 혈관성 또는 혈관형성 세포의 용도 및 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포의 용도를 제공한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 질환, 질병 또는 병태는 말초 혈관 질환, 급성 또는 만성 심근경색증, 심근병증, 울혈성 또는 만성 심부전, 심혈관 허혈, 고혈압성 폐 혈관 질환, 말초 동맥 질환, 또는 류마티스 심장병이다.

[0043] 하나의 측면에서, 본원에서는 다수의 태반 관류액 세포가 혈관계 또는 심장계 세포로, 예를 들어, 혈관 세포, 예를 들어, 내피 세포로, 또는 심장 세포로 분화할 수 있는 조건과 태반 관류액 또는 관류액 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 혈관형성 또는 혈관성 세포, 예를 들어, 혈관계를 형성할 수 있는 능력을 가진 혈관형성 또는 혈관성 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 생체내에서 이루어진다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 시험관내에서 이루어지는데, 예를 들면, 세포가 혈관계 또는 심장계 세포로 분화하거나, 상기 세포의 특징들을 보이는 조건하에서 상기 관류액 또는 상기 관류액 세포를 배양함으로써 이루어진다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 하나 이상의 특징으로는 혈관 또는 혈관-유사 구조 형성을 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 배양은 상기 관류액 세포, 예를 들어, 상기 $CD34^+$ 태반 세포를 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-β), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 플라스미노겐, 조직 플라스미노겐 활성 인자 (tPA) 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제와 접촉시키는 것을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 상기 접촉이 상기 관류액 세포를 VEGF (50 내지 200 ng/mL), TGF-β (1 내지 5 ng/mL), FGF (10 내지 50 ng/mL) 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제 (각각 1 내지 3 유니트/mL)와 접촉시키는 것을 포함하는데, 예를 들면, 여기서, 상기 VEGF, TGF-β, FGF 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제는 매트릭스, 예를 들어, 마트리겔 (Matrigel)에 포함되어 있다. 상기 매트릭스 메탈로프로테아제는 임의의 매트릭스 메탈로프로테아제 또는 매트릭스 메탈로프로테이나제 조합물, 예를 들어, 매트릭스 메탈로프로테이나제 1, 3 및 4의 조합물일 수 있다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 배양은 18-24시간 동안 이루어진다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상

기 세포는, 상기 접촉 후 24시간이 경과한 후에 보이는 혈관 구조를 형성한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는 24시간이 경과한 후에 보이는 혈관 구조를 형성하되, 제대혈로부터의 $CD34^+$ 줄기 세포는 보이는 혈관 구조를 형성하지 못하거나, 검출가능하게는 상기 관류액 세포 또는 $CD34^+$ 태반 세포보다 더 적은 혈관 구조를 형성하는 것인 조건하에서 상기 접촉이 이루어진다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 시험관내에서 실시된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 생체내에서 실시된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 생체내 접촉은 포유동물에서 실시된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 포유동물은 인간이다.

[0044] 특정 실시태양에서, 본원에서는 태반 관류액 세포 군집을, 혈관 형성을 촉진시키는 조건과 접촉시키는 단계를 포함하는, 상기 태반 관류액 세포 군집으로부터 혈관을 형성하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 시험관내에서 실시된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 생체내에서 실시된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 단일의 태반 관류로부터 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+CD45^-$ 세포이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포 또는 $CD34^+CD45^-$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR 중 적어도 하나를 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 상기 관류액으로부터 단리된 것이 아닌 (예를 들면, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 골수 등으로부터 단리된) 단리된 $CD34^+$ 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 태반으로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 골수로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+$, $CD45^-$ 세포이다.

[0045] 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 상기 태반 관류액 세포는 태반 줄기 세포 또는 태반 기원 세포, 예를 들어, $CD34^+$ 태반 세포, 예를 들면, $CD34^+$ 태반 내피 기원 세포를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "$CD34^+$ 태반 세포"는 태반 혈액이나 제대혈이 아닌, 태반으로부터 수득된 $CD34^+$ 세포를 지칭한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포, 예를 들어, 상기 $CD34^+$ 태반 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준의 양으로 하나 이상의 혈관형성-관련 마커를 생산한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD45^-$이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 마커는 CD31, VEGF-R 및/또는 CXCR4를 포함한다. 다른 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD44^-$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, 또는 $CD166^+$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, 및 $CD166^+$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, 또는 $CD200^+$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, 및 $CD200^+$이다. 특정 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 $CD34^+CD45^-$ 세포이다. 특정의 다른 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다.

[0046] 특정 실시태양에서, 본원에 기술된 $CD34^+$ 세포 중 임의의 것, 또는 $CD34^+$ 세포 군집은 확장된다.

[0047] 또다른 측면에서, 본원에서는 심장 또는 혈관 기능부족의 하나 이상의 증상을 검출가능할 정도로 개선시키거나, 또는 상기 증상 악화를 감소시키는데 충분한 양으로 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 심장 또는 혈관 기능부족 또는 결손을 앓는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 예를 들어, 상기 개체에서 혈관형성 또는 혈관형성을 촉진시킴으로써 심장 또는 혈관 기능부족 또는 결손을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 삽입형 또는 주사용 조성물에 포함되어 있다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 본원에서 제공하는 조성물에 포함되어 있다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 다수의 $CD34^+$ 태반 세포, 부착성 태반 세포, 또

는 그 둘 모두로 보충된다.

[0048] 또다른 실시태양에서, 본원에서는 심장 또는 혈관 질환, 질병, 병태 또는 기능부족을 치료하는데 충분한 양으로 인간 태반 관류액 세포를 상기 질환, 질병, 병태 또는 기능부족을 앓는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심장 또는 혈관 질환, 질병, 병태 또는 기능부족을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 질환, 질병, 병태 또는 기능부족은 말초 혈관 질환, 급성 또는 만성 심근경색증, 심근병증, 울혈성 또는 만성 심부전, 심혈관 허혈, 고혈압성 폐 혈관 질환, 말초 동맥 질환, 또는 류마티스 심장병이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 단일의 태반 관류로부터 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 군집은 상기 관류액으로부터 단리된 것 이외의, 단리된 $CD34^+$ 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 태반으로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 골수로부터 단리된 것이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD34^+$ 세포는, 제대혈로부터 수득된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 더 높은 수준으로 CD31, CXCR4 또는 VEGFR을 발현한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 스캐폴드 또는 매트릭스 상에 존재하는 상태로 투여된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 정맥내로 투여된다.

[0049] 태반 관류액, 관류액 세포, 관류액 또는 관류액 세포와 기타 다른 세포의 조합물, 및 상기를 포함하는 조성물, 예를 들어, 약제학적 조성물은 하기 섹션에서 상세히 기술한다.

[0050] 5.2 태반 관류액 및 관류액 세포를 수득하는 방법

[0051] 본원에서는 포유동물 태반으로부터 태반 관류액 및 태반 관류액 세포를 수득하는 방법을 제공한다. 본원에 기술된 모든 실시태양에서, 바람직한 관류액은 인간 태반 관류액이고, 바람직한 관류액 세포는 인간 태반 관류액 세포이다.

[0052] 5.2.1 태반 수집 및 취급

[0053] 일반적으로, 인간 태반은 출산 후 그의 만출 직후에 회수된다. 바람직한 실시태양에서, 태반은 환자로부터 사전 동의 후에, 그리고 이 환자의 완전한 병력을 취하여 태반과 관련시킨 후에 회수된다. 바람직하게는, 병력이 분만 이후에 계속된다. 그러한 병력은 태반 또는 그로부터 수거된 줄기 세포의 후속 이용을 조정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 태반 줄기 세포는, 병력에 비추어서, 태반에 관련된 영아, 또는 영아의 부모, 형제자매 또는 기타 친척의 맞춤형 의약에 사용될 수 있다.

[0054] 태반 줄기 세포의 회수 전에, 제대혈 및 태반 혈액이 제거된다. 특정 실시태양에서, 분만 후, 태반 내의 제대혈이 회수된다. 통상적인 제대혈 회수 공정을 태반에 적용시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 예를 들어, 바늘 또는 캐뉼러가 중력의 도움으로 태반을 방혈시키는데 사용된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 제5,372,581호 (앤더슨(Anderson)); 미국 특허 번호 제5,415,665호 (헤셀(Hessel) 등) 참조). 바늘 또는 캐뉼러는 일반적으로 배꼽 정맥에 놓이고, 태반으로부터 제대혈이 배수되는 것을 돕도록 태반을 부드럽게 마사지할 수 있다. 그러한 제대혈 회수는 상업적으로, 예를 들어, 라이프뱅크 USA(LifeBank USA), 세다 놀스(Cedar Knolls, 뉴저지 소재), 비아코드(ViaCord), 코드 블러드 리지스트리(Cord Blood Registry) 및 크라이오셀(Cryocell)에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 제대혈이 회수되는 동안 조직 파괴를 최소화시키기 위해서 추가의 조작없이 중력에 의해서 태반을 배수시킨다.

[0055] 전형적으로, 예를 들어, 관류 또는 조직 해리에 의한 제대혈의 회수 및 줄기 세포의 수집을 위해 태반은 분만실 또는 출산실에서 또다른 장소, 예를 들어 실험실로 수송된다. 예를 들면, 근위부 제대를 클랭핑하여 태반을 무균 집록식(zip-lock) 플라스틱 백에 놓은 후, 단열 용기에 놓음으로써 (태반의 온도를 20-28℃로 유지시켜 주는) 무균의 단열 수송 장치 중에서 태반을 수송하는 것이 바람직하다. 또다른 실시태양에서, 실질적으로 계류 중인 미국 특허 출원 번호 제11/230,760호 (2005년 9월 19일자로 출원)에 기재된 바와 같이 제대혈 수집 키트 중에서 태반을 수송한다. 태반은 분만 후 4시간 내지 24시간 내에 실험실로 수송되는 것이 바람직하다. 특정 실시태양에서, 제대혈 회수 이전에 태반 원반 내로의 제대 삽입부의 4-5 cm (센티미터) 이내에서 근위부 제대를 클랭핑하는 것이 바람직하다. 다른 실시태양에서, 제대혈 회수 후에, 그러나 태반을 추가로 공정처리하기 이전에 근위부 제대를 클랭핑한다.

[0056] 줄기 세포 수집 이전에 태반을 무균 조건하에 실온 또는 5 내지 25℃ (섭씨)의 온도에서 보관할 수 있다. 태

반은 임의의 잔류 제대혈을 제거하기 위해서, 태반을 관류시키기 이전에 48시간보다 긴 장기간 동안, 및 바람직하게는 4 내지 24시간의 기간 동안 보관할 수 있다. 태반은 5 내지 25℃ (섭씨)의 온도에서 항응고제 용액 중에서 보관하는 것이 바람직하다. 적합한 항응고제 용액은 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와파린 나트륨 용액이 사용될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액 (예를 들어, 1:1000 용액 중 1% w/w)을 포함한다. 방혈된 태반을 최대 36시간 동안 보관한 후, 태반 줄기 세포를 수집하는 것이 바람직하다.

[0057] 일단 일반적으로 상기와 같이 수집 및 제조되면, 포유동물 태반 또는 그의 일부를 임의의 당업계에 공지된 방식으로 처리할 수 있는데, 예를 들어, 관류 또는 파괴할 수 있고, 예를 들어, 하나 이상의 조직-파괴 효소로 분해시켜 줄기 세포를 수득할 수 있다.

[0058] 5.2.2 태반 관류

[0059] 포유동물 태반을 관류시키는 방법은 예를 들어, 미국 출원 공개 번호 제2002/0123141호 (해리리(Hariri)), 및 미국 출원 번호 제11/648,812호 (발명의 명칭: "Improved Composition for Collecting and Preserving Organs", 2006년 12월 28일 출원)에 개시되어 있다.

[0060] 관류액은, 상기 기술된 바와 같이, 관류 용액, 예를 들어, 염수 용액, 배양 배지 또는 세포 수집 조성물을 태반 혈관계를 통해 통과시킴으로써 수득할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 배꼽 동맥 및 배꼽 정맥 중 어느 한쪽 또는 양쪽 모두를 통해 관류 용액을 통과시킴으로써 포유동물 태반이 관류된다. 태반을 통과하는 관류 용액의 흐름은 예를 들어, 태반 내로의 중력 흐름을 사용함으로써 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 펌프, 예를 들어, 연동식 펌프를 사용하여 태반을 통과하도록 관류 용액을 밀어 넣는다. 예를 들어, 무균 연결 기구, 예로서, 무균 배관에 연결된 캐뉼러, 예를 들어, 테플론(TEFLON)® 또는 플라스틱 캐뉼러를 배꼽 정맥에 꽂을 수 있다. 무균 연결 기구는 관류 매니폴드에 연결된다.

[0061] 관류 준비를 위해 배꼽 동맥 및 배꼽 정맥이 태반의 최고점에 위치하도록 하는 방식으로 태반을 놓이게 하는 것 (예를 들어, 현수시키는 것)이 바람직하다. 관류 용액을 태반 혈관계를 통해, 또는 태반 혈관계와 주변 조직을 통해 통과시킴으로써 태반은 관류될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 배꼽 동맥 및 배꼽 정맥은 동시에, 가요성 연결부를 통해 관류 용액의 저장소에 연결된 피펫에 연결된다. 관류 용액이 배꼽 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액이 태반의 주변 조직 내로 혈관의 벽으로부터 삼출되고/거나 이러한 벽을 통과하고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적절한 개방형 베쓸에 수집된다. 또한 관류 용액이 제대 개구부를 통해 도입되어, 모체의 자궁 벽과 계면한 태반의 벽 내의 개구부에서 흘러 나오거나 스며나오게 될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 관류 용액은 배꼽 정맥을 통과하여 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 또는 배꼽 동맥을 통과하여 배꼽 정맥으로부터 수집되는데, 즉, 오직 태반 혈관계 (태아 조직)만을 통과한다.

[0062] 하나의 실시태양에서, 예를 들면, 배꼽 동맥 및 배꼽 정맥은 동시에, 가요성 연결부를 통해 관류 용액의 저장소에 연결된 피펫에 연결된다. 관류 용액이 배꼽 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액이 태반의 주변 조직 내로 혈관의 벽으로부터 삼출되고/거나 이러한 벽을 통과하고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적절한 개방형 베쓸에 수집된다. 또한 관류 용액이 제대 개구부를 통해 도입되어, 모체의 자궁 벽과 계면한 태반의 벽 내의 개구부에서 흘러 나오거나 스며나오게 될 수 있다. "팬(pan)" 방법으로 지칭될 수 있는 상기 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

[0063] 또다른 실시태양에서, 관류 용액은 배꼽 정맥을 통과하여 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 또는 배꼽 동맥을 통과하여 배꼽 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로" 방법으로도 지칭되는 상기 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 전적으로 태아 세포이다.

[0064] 하나의 실시태양에서, 폐쇄 회로 관류 방법이 하기와 같이 수행될 수 있다. 분만 후의 태반을 출산 후 약 48시간 이내에 수득한다. 제대를 클램핑하고, 클램프 위쪽을 절단한다. 제대를 버릴 수 있거나, 또는 예를 들어, 제대 줄기 세포를 회수하기 위해 및/또는 생체물질의 생산을 위해 제대막을 공정처리하기 위한 목적으로 공정처리할 수 있다. 양막이 관류 동안 유지될 수 있거나, 또는 예를 들어, 손가락을 이용한 비절개 박리를 사용하여, 융모막으로부터 분리될 수 있다. 양막이 관류 이전에 융모막으로부터 분리되는 경우, 이는 버릴 수 있거나, 또는 예를 들어, 효소 분해에 의해 줄기 세포를 수득하기 위해, 또는 예를 들어, 양막 생체물질, 예를 들어, 미국 출원 공개 번호 제2004/0048796호 (상기 문헌의 개시 내용은 본원에서 참고로 인용된다)에 기재된 생체물질을 생산하기 위해, 공정처리될 수 있다. 모든 보이는 혈병과 잔류 혈액으로 이루어진 태반을 예를 들어, 무균 거즈를 사용하여, 깨끗이 한 후, 예를 들어, 제대막을 부분적으로 절단하여 제대의 단면을 노출시킴으

로써, 제대 혈관을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들어, 닫힌 엘리게이터 클램프를 각각의 혈관의 절단 끝부분을 통해 전진시킴으로써, 개방시킨다. 이어서, 관류 장치 또는 연동식 펌프에 연결된 플라스틱 배관과 같은 기구를 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적합한 임의의 펌프, 예를 들어, 연동식 펌프일 수 있다. 이어서, 무균 수집 저장소, 예를 들어, 250 mL 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 배관을 태반 정맥 내로 삽입한다. 별법으로, 펌프에 연결된 배관을 태반 정맥 내로 삽입하고, 수집 저장소(들)에 달린 관을 태반 동맥 중 하나 또는 양쪽 모두에 삽입한다. 이어서, 태반을 다량의 관류 용액, 예를 들어, 약 750 mL의 관류 용액으로 관류한다. 이어서, 관류액 중의 세포를, 예를 들어, 원심분리에 의해 수집한다.

[0065] 하나의 실시태양에서, 관류 동안 근위부 제대를 클랭핑하고, 태반 원반 내로의 제대 삽입부의 4-5 cm (센티미터) 이내에서 근위부 제대를 클랭핑하는 것이 더욱 바람직하다.

[0066] 특정 실시태양에서, 제대혈은 (예를 들어, 중력 배수에 의해서) 관류 이전에 태반으로부터 제거되지만, 태반은 잔류 혈액을 제거하는 용액으로는 플러싱 (예로서, 관류)되지 않는다. 그러한 실시태양에서, 포유동물 태반으로부터의 관류 유체의 1차 수집물은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구의 색을 띤다. 관류가 진행되고 잔류 제대혈 세포가 태반으로부터 세정됨에 따라 관류 유체는 더욱 무색이 된다. 일반적으로, 30 내지 100 mL 관류 유체가 초기에 잔류 제대혈 세포를 제거하는데 적절하다.

[0067] 다른 실시태양에서, 제대혈은 (예를 들어, 중력 배수에 의해서) 관류 이전에 태반으로부터 제거되고, 태반은 관류 이전에 잔류 혈액을 제거하는 용액으로 플러싱 (예로서, 관류)됨으로써 태반 줄기 세포 또는 태반 관류액 세포를 회수하게 된다.

[0068] 태반을 관류시키는데 사용되는 관류 액체의 부피는 수집하고자 하는 태반 세포의 갯수, 태반의 크기, 단일의 태반으로부터 제조되는 수집물의 갯수에 따라 달라질 수 있다. 각종 실시태양에서, 관류 액체의 부피는 50 mL 내지 5000 mL, 50 mL 내지 4000 mL, 50 mL 내지 3000 mL, 100 mL 내지 2000 mL, 250 mL 내지 2000 mL, 500 mL 내지 2000 mL, 또는 750 mL 내지 2000 mL일 수 있다. 전형적으로, 태반은 방혈 후에 700-800 mL의 관류 액체로 관류된다.

[0069] 태반을 수시간 또는 수일 동안 다회에 걸쳐 관류시킬 수 있다. 태반을 다회에 걸쳐 관류시키고자 하는 경우, 태반을 용기 또는 기타 적합한 베쓸에서 무균 조건하에 유지시키거나 배양할 수 있고, 세포 수집 조성물 또는 표준 관류 용액 (예를 들어, 생리 식염수 용액, 예로서, 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와파린 나트륨, 쿠마린, 비스하이드록시쿠마린)를 포함하거나, 포함하지 않거나, 및/또는 항미생물제 (예를 들어, β-메르캅토에탄올 (0.1 mM)); 항생제, 예로서, 스트렙토마이신 (예를 들어, 40-100 ㎍/mL), 페니실린 (예를 들어, 40 U/mL), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 ㎍/mL)를 포함하거나, 포함하지 않는 인산염 완충처리된 염수 ("PBS"))으로 관류시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 관류 및 관류액의 수집 이전에 태반이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간, 또는 2일 또는 3일 또는 그 이상 동안 유지 또는 배양되도록, 관류액을 수집하지 않으면서 일정 기간 동안 단리된 태반을 유지 또는 배양시킨다. 관류된 태반은 1회 이상의 추가적인 시간(들) 동안, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간, 또는 그 이상 동안 유지된 후, 예를 들어, 700-800 mL의 관류 유체로 2번째로 관류될 수 있다. 태반은 1, 2, 3, 4, 5회 또는 그 이상으로 관류될 수 있고, 예를 들어, 매 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 관류될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어, 줄기 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 유핵 세포의 갯수가 1 mL당 100개 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 상이한 시점의 관류액들을 개별적으로 추가적으로 공정처리하여 시간 의존형의, 세포, 예를 들어, 전체 유핵 세포 군집을 회수할 수 있다. 상이한 시점으로부터의 관류액들을 또한 풀링할 수 있다.

[0070] 5.2.3 태반 세포 수집 조성물

[0071] 임의의 생리학적으로 허용가능한 용액, 예를 들어, 염수 용액, 배양 배지, 또는 추가의 복합 세포 수집 조성물을 사용하여 태반을 관류시킴으로써 태반으로부터 관류액을 수집할 수 있다. 세포 수집 조성물은 관련된 미국 출원 공개 번호 제2007/0190042호 (이들 둘 모두 그의 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있다.

[0072] 세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 임의의 생리학적으로 허용가능한 용액, 예를 들면, 염수 용액 (예를 들어, 인산염 완충처리된 염수, 크렙(Kreb) 용액, 변형 크렙 용액, 이글스(Eagle's) 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H. DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0073] 세포 수집 조성물은 태반 세포를 보존하는 경향이 있는, 즉, 사멸로부터 태반 세포를 보호하는 것, 또는 수집

시간에서부터 배양 시간까지 태반 세포의 사멸을 지연시키는 것, 사멸하는 세포 군집 내의 태반 세포의 갯수를 감소시키는 것 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 그러한 성분은 예를 들어, 아포프토시스 저해제 (예를 들어, 카스파제 저해제 또는 JNK 저해제); 혈관확장제 (예를 들어, 황산마그네슘, 고혈압약, 심방 나트륨 이뇨 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-분비 호르몬, 나이트로프루사이드나트륨, 하이드랄라진, 아데노신 삼인산염, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포디에스테라제 저해제 등); 괴사 저해제 (예를 들어, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카르바메이트, 또는 클로나제팜); TNF-α 저해제; 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0074] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 하이알루로니다제, RNase, 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 그러한 효소로는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리디움 히스톨리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 써모리신, 엘라스타제, 트립신, 리베라제(LIBERASE), 하이알루로니다제 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0075] 세포 수집 조성물은 살균 유효량 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 비-제한적인 특정 실시태양에서, 항생제는 마크롤리드 (예를 들어, 토브라마이신), 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 V) 또는 퀴놀론 (예를 들어, 오플록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시태양에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 세균, 예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코쿠스 아루레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성을 띤다.

[0076] 세포 수집 조성물은 또한 하기 화합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아데노신 (약 1 mM 내지 약 50 mM); D-글루코스 (약 20 mM 내지 약 100 mM); 마그네슘 이온 (약 1 mM 내지 약 50 mM); 분자량이 20,000 달톤을 초과하는 거대분자 (하나의 실시태양에서는 내피 통합성 및 세포 생육성을 유지하는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 합성 또는 천연적으로 발생된 콜로이드, 다당류, 예로서, 덱스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜 (약 25 g/ℓ 내지 약 100 g/ℓ, 또는 약 40 g/ℓ 내지 약 60 g/ℓ로 존재)); 항산화제 (예를 들어, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E (약 25 μM 내지 약 100 μM로 존재)); 환원제 (예를 들어, N-아세틸시스테인 (약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재)); 세포 내로의 칼슘 유입을 방지하는 제제 (예를 들어, 베라파밀 (약 2 μM 내지 약 25 μM로 존재)); 니트로글리세린 (예를 들어, 약 0.05 g/ℓ 내지 약 0.2 g/ℓ); 항응고제 (하나의 실시태양에서, 잔류 혈액의 응고 방지에 도움이 되는 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 헤파린 또는 히루딘 (약 1000 유니트/ℓ 내지 약 100,000 유니트/ℓ로 존재)); 또는 아밀로리드 함유 화합물 (예를 들어, 아밀로리드, 에틸 이소프로필 아밀로리드, 헥사메틸렌 아밀로리드, 디메틸 아밀로리드 또는 이소부틸 아밀로리드 (약 1.0 μM 내지 약 5 μM로 존재)).

[0077] 5.2.4 태반 관류액 및 태반 관류액 세포

[0078] 태반 관류액은 이종성의 세포 수집물을 포함한다. 전형적으로, 사용하기 이전에 태반 관류액에서 적혈구를 제거한다. 유핵 혈액 세포로부터 적혈구를 분리시키는 공지 방법에 의해서 상기 적혈구 제거를 수행할 수 있다. 특정 실시태양에서, 관류액 또는 관류액 세포는 냉동보존된다. 특정의 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 또는 관류액 세포는 오직 태아 세포만을 포함하거나, 태아 세포와 모체 세포의 조합물을 포함한다.

[0079] 전형적으로, 단일의 태반 관류로부터 수득된 태반 관류액은 약 1억 내지 약 5억개의 유핵 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 기원 세포 또는 내피 기원 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 세포는 $CD34^+CD45^-$ 줄기 세포 또는 기원 세포, $CD34^+CD45^+$ 줄기 세포 또는 기원 세포, 골수성 기원 세포, 림프성 기원 세포, 및/또는 적혈구계 기원 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액 및 태반 관류액 세포는 부착성 태반 줄기 세포, 예를 들어, $CD34^-$ 줄기 세포, 예를 들어, 상기 섹션 5.1에 기술된 세포를 포함한다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액 및 태반 관류액 세포는 예를 들어, 내피 기원 세포, 골기원 세포, 및 자연살세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 태반으로부터 수집되고 적혈구가 제거된 태반 관류액, 또는 상기 관류액으로부터 단리된 관류액 세포는 예를 들어, 유세포측정, 예를 들어, FACS 분석에 의해 측정된 바, 약 6-7% 자연살세포 ($CD3^-$, $CD56^+$); 약 21-22% T 세

포 ($CD3^+$); 약 6-7% B 세포 ($CD19^+$); 약 1-2% 내피 기원 세포 ($CD34^+$, $CD31^+$); 약 2-3% 신경 기원 세포 (네스틴$^+$); 약 2-5% 조혈 기원 세포 ($CD34^+$); 및 약 0.5-1.5% 부착성 태반 줄기 세포 (예를 들어, $CD34^-$, $CD117^-$, $CD105^+$ 및 $CD44^+$)를 포함한다.

[0080] 인간 태반 관류액 중의 $CD34^+$ 줄기 세포 또는 기원 세포는, 제대혈로부터 단리된 같은 갯수의 $CD34^+$ 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 혈관형성-관련 마커, 예를 들어, CD31, VEGF-R 및/또는 CXCR4를 발현한다. 특정 실시태양에서, VEGF (CFU-Hill 콜로니 성장용 VEGF: 스템셀 테크놀로지스 인크.(StemCell Technologies, Inc.))를 포함하는 엔도컬트® 배지에서 배양된, 단일의 관류로부터 수득된 인간 태반 관류액 단핵 세포는 약 20개 이하, 예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 CFU-Hill 콜로니 (내피 세포 기원 세포)를 생성한다. 액체 배양물 중의 CFU-Hill 콜로니 발생은 예를 들면, 엔도컬트® 배지에서의 배양 7일째에 인간 태반 관류액으로부터 수득된 내피 기원 세포가 흡수하는 디아세틸화된 저밀도 리포단백질 (Dil-acLDL)의 흡수량을 측정함으로써 입증 및 평가될 수 있다.

[0081] 다른 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD44^-$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD9^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, 또는 $CD166^+$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD9^+$, $CD54^+$, CD90+, 및 $CD166^+$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, 또는 $CD200^+$이다. 특정 실시태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD31^+$, $CD117^+$, $CD133^+$, 및 $CD200^+$이다.

[0082] 하나의 실시태양에서, 인간 태반 관류액 세포는 배양되면, 혈관 또는 혈관-유사 구조를 형성한다. HPP 세포의 혈관 형성은 예를 들면, TGF-β (형질전환 성장 인자 베타), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 플라스미노겐, 조직 플라스미노겐 활성 인자 (tPA), 및 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP)의 존재하에 매트릭스, 예를 들어, EC매트릭스(ECMATRIX)™ 상에서 세포, 예를 들어, 약 5 x 10^5개의 세포를 배양함으로써 입증할 수 있다. 혈관 또는 혈관-유사 구조는 24시간이 경과한 후에 형성된다. 동일한 조건하에서 배양된 제대혈 단핵 세포에서는 어떤 유의적인 혈관 형성도 관찰되지 않았다. 혈관 형성은 또한 관류액 세포를 VEGF (50 내지 200 ng/mL), TGF-β (1 내지 5 ng/mL), FGF (10 내지 50 ng/mL) 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제 (각각 1 내지 3 유니트/mL)와 접촉시켜 배양함으로써도 관찰할 수 있는데, 예를 들면, 여기서, 상기 VEGF, TGF-β, FGF 및 하나 이상의 매트릭스 메탈로프로테아제는 매트릭스, 예를 들어, 마트리겔에 포함되어 있다.

[0083] 또한, 인간 태반 관류액으로부터의 $CD34^+CD45^-$ 세포는 $CD34^+CD45^+$ 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 혈관 형성 관련 마커 CD31 및/또는 VEGFR을 발현한다.

[0084] 전형적으로, 태반 관류액 및 관류액 세포는 제대혈 세포에 비하여 제I류 MHC의 낮은 발현을 갖고, 대개는 제II류 MHC 마커에 대하여 음성을 띤다.

[0085] 5.2.5 태반 세포의 단리, 분류 및 특징 규명

[0086] 포유동물 태반으로부터의 세포, 예를 들어, 관류액으로부터의 관류액 세포 또는 줄기 세포를 피콜 (Ficoll) 구배 원심분리에 의해 다른 세포로부터 정제할 수 있다 (즉, 단리시킬 수 있다). 상기와 같은 원심분리는 원심분리 속도 등에 대한 임의의 표준 프로토콜을 따를 수 있다. 하나의 실시태양에서, 예를 들면, 태반으로부터 수집된 세포가 실온에서 15분 동안의 5000 x g의 원심분리에 의해 관류액으로부터 회수되고, 이는 세포를 예를 들어, 오염성 잔해물 및 혈소판으로부터 분리한다. 또다른 실시태양에서, 태반 관류액을 약 200 ml로 농축시키고, 부드럽게 피콜 상에 층상화하고, 22℃에서 20분 동안 약 1100 x g으로 원심분리하여, 세포의 저밀도 계면층을 추가적인 공정처리를 위해 수집한다.

[0087] 세포 펠릿을 상기 기술된 바와 같은 신선한 세포 수집 조성물, 또는 줄기 세포 유지에 적합한 배지, 예를 들어, 2 U/ml 헤파린 및 2 mM EDTA (뉴욕주 소재의 기브코BRL(GibcoBRL))를 함유하는 IMDM 무혈청 배지에 재현탁시킬 수 있다. 예를 들어, 림포프렙(Lymphoprep) (노르웨이 오슬로 소재의 나이코메드 파마(Nycomed Pharma))을 제조사의 권장 절차에 따라 사용하여 전체 단핵 세포 분획을 단리시킬 수 있다.

[0088] 본원에서 사용되는 바, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포로부터 태반 세포, 예를 들어, 줄기 세포 또는 기원 세포를 "단리시킨다"는 것은 온전한 포유동물 태반에서 정상적으로 상기 세포와 회합하는 세포의 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%를 제거하는 것을 의미한다. 한 장기로부터의 세포는,

온전한 장기에서 정상적으로 상기 세포와 회합하는 세포의 50% 미만을 포함하는 세포의 군집 내에 존재하는 경우, "단리"된 것이다.

[0089] 관류에 의해 수득된 태반 세포, 예를 들어, 상기 기술된 부착성 태반 줄기 세포는, 예를 들어, 추가로 또는 초기에, 예를 들면, 0.2% EDTA를 함유하는 0.05% 트립신 용액 (미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마(Sigma))을 사용하는 차등 트립신처리에 의해 단리시킬 수 있다. 전형적으로 줄기 세포는 플라스틱 표면으로부터 약 5분 이내에 탈착되는 반면, 전형적으로 태반 관류액 중의 기타 다른 부착성 세포 군집은 20-30분을 초과하는 인큐베이션을 필요로 하기 때문에 부착성 태반 줄기 세포의 차등 트립신처리가 가능하다. 트립신처리 및 트립신 중화, 예를 들면, 트립신 중화 용액 (TNS, 캠브렉스(Cambrex)) 등을 이용한 것)에 이어서, 태반 줄기 세포를 수거할 수 있다. 부착성 세포를 단리시키는 하나의 실시태양에서, 예를 들면, 약 5-10 x 10^6개의 세포의 분취량을 각각의 여러 T-75 플라스크, 바람직하게는 피브로넥틴이 코팅된 T-75 플라스크에 담는다. 상기 실시태양에서, 세포를 상업적으로 이용가능한 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM) (캠브렉스)와 함께 배양하고, 조직 배양 인큐베이터 (37℃, 5% CO_2) 내에 놓을 수 있다. 10-15일 후, PBS로 세척함으로써 비-부착성 세포를 플라스크로부터 제거한다. 이어서, PBS를 MSCGM 으로 대체한다. 바람직하게는 플라스크를 각종 부착성 세포 유형의 존재에 대해, 특히 섬유모세포양 세포의 클러스터의 확인 및 확장에 대해 매일 검사한다.

[0090] 포유동물 태반으로부터 수집된 세포의 수 및 유형을 예를 들면, 유세포측정, 세포 분류, 면역세포화학 (예를 들어, 조직 특이적 또는 세포-마커 특이 항체로의 염색), 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 자기 활성화 세포 분류 (MACS)와 같은 표준 세포 검출 기법을 사용하여 형태 및 세포 표면 마커에서의 변화를 측정하는 것에 의해, 광현미경 또는 공초점 현미경을 사용하는 세포 형태 검사에 의해, 및/또는 당업계에 주지된 기법, 예로서, PCR 및 유전자 발현 프로파일링을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정하는 것에 의해, 모니터링할 수 있다. 이러한 기법들은 하나 이상의 특정 마커에 대해 양성인 세포들을 확인하는데에도 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, CD34에 대한 항체를 사용하여, 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는지 여부를 상기의 기법을 사용함으로써 결정할 수 있다; 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함한다면, 세포는 $CD34^+$이다. 마찬가지로, RT-PCR에 의해 검출가능한 충분한 OCT-4 RNA, 또는 성체 세포보다 유의적으로 더 많은 OCT-4 RNA를 세포가 생산한다면, 세포는 $OCT\text{-}4^+$이다. 세포 표면 마커 (예를 들어, CD34와 같은 CD 마커), 및 예로서, OCT-4와 같은 줄기 세포-특이 유전자의 서열은 당업계에 주지되어 있다.

[0091] 태반 세포, 특히, 피콜 분리, 차등 부착 또는 상기 둘의 조합에 의해 단리된 세포를 형광 활성화 세포 분류기 (FACS)를 사용하여 분류할 수 있다. 형광 활성화 세포 분류 (FACS)는 입자의 형광 특성을 기초로 하는, 세포를 비롯한 입자를 분리하기 위한 주지된 방법이다 (문헌 [Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165]). 개별적인 입자들 내의 형광 모이어티의 레이저 여기로 작은 전하가 발생하고, 이로써 혼합물로부터 양성 입자와 음성 입자가 전자기적으로 분리될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 세포 표면 마커-특이 항체 또는 리간드는 상이한 형광 표지로 표지된다. 세포가 세포 분류기를 통과하여 공정처리됨으로써 사용된 항체에 결합할 수 있는 능력에 기초하여 세포가 분리될 수 있다. FACS로 분류된 입자들이 96-웰 또는 384-웰 플레이트의 개별적인 웰 내로 직접 침착됨으로써 용이하게 분리 및 클로닝될 수 있다.

[0092] 하나의 세포 분류 계획에서, 태반으로부터의 줄기 세포는 마커 CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 및/또는 HLA-G의 발현을 기초로 분류된다. 이는 배양시 세포의 부착 특성을 기초로 줄기 세포를 선별하는 절차와 함께 이루어질 수 있다. 예를 들면, 줄기의 부착성 선별은 마커 발현을 기초로 하는 분류 이전 또는 이후에 이루어질 수 있다. 하나의 실시태양에서, 예를 들면, 세포는 먼저 CD34의 발현을 기초로 분류된다; $CD34^-$ 세포는 유지되고, $CD200^+HLA\text{-}G^+$인 세포를 모든 다른 $CD34^-$ 세포로부터 분리한다. 또다른 실시태양에서, 태반으로부터의 세포는 마커 CD200 및/또는 HLA-G의 발현에 기초한다; 예를 들면, 이러한 마커들 중 하나를 디스플레이하는 세포는 추가적인 사용을 위해 단리된다. 구체적인 실시태양에서, 예를 들어, CD200 및/또는 HLA-G를 발현하는 세포는 CD73 및/또는 CD105, 또는 항체 SH2, SH3 또는 SH4가 인식하는 에피토프의 발현, 또는 CD34, CD38 또는 CD45의 발현 결여를 기초로 추가로 분류될 수 있다. 예를 들면, 하나의 실시태양에서, 태반 세포는 CD200, HLA-G, CD73, CD 105, CD34, CD38 및 CD45의 발현 또는 발현 결여에 의해 분류되고, $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$, $CD73^+$, $CD105^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$인 태반 세포가 추가적인 사용을 위해 다른 태반 세포들로부터 단리된다.

[0093] 또다른 실시태양에서, 태반 관류액 세포는 $CD34^+$의 발현에 기초하여, 및 하나 이상의 혈관형성 마커, 예를

들어, CXCR4, VEGFR 및/또는 CD31의 발현에 기초하여 분류된다.

[0094] 또다른 실시태양에서, 자기 비드를 사용하여 세포를 분리할 수 있다. 자기 비드 (직경 0.5-100 ㎛)에 결합할 수 있는 능력을 기초로 입자를 분류하는 방법인 자기 활성화 세포 분류 (MACS)를 사용하여 세포들을 분류할 수 있다. 특정 세포 표면 분자 또는 합텐을 특이적으로 인식하는 항체를 공유 결합으로 부가하는 것을 비롯한, 각종의 유용한 변형을 자기 미세구에 수행할 수 있다. 이어서, 비드를 세포와 혼합하여 결합할 수 있도록 한다. 이어서, 세포를 자기장에 통과시켜, 특정 세포 표면 마커가 있는 세포를 분리해 낸다. 하나의 실시태양에서, 이어서 이러한 세포들을 단리시키고, 추가적인 세포 표면 마커에 대한 항체에 커플링된 자기 비드와 재혼합한다. 세포를 자기장에 다시 통과시켜 양쪽 항체에 결합한 세포를 단리시킨다. 이어서, 상기 세포를 별개의 접시, 예로서, 클론성 단리를 위한 미량역가 접시 내로 희석할 수 있다.

[0095] 세포 형태 및 성장 특징을 기초로 하여 태반 세포를 또한 그의 특징에 대해 규명할 수 있고/거나, 분류할 수 있다. 예를 들면, 태반 세포, 예를 들어, 부착성 태반 줄기 세포는 예를 들어, 배양시 섬유모세포양 외관을 갖는 것으로 그의 특징이 규명되고/되거나 이러한 외관을 기초로 선별될 수 있다. 또한 태반 세포는 배양체-유사체를 형성할 수 있는 능력이 있는 것으로 그의 특징이 규명되고/되거나 이러한 능력을 기초로 선별될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 예를 들면, 섬유모세포양 형상이고, CD73 및 CD105를 발현하며, 배양시 하나 이상의 배양체-유사체를 형성하는 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 실시태양에서, 배양시 하나 이상의 배양체-유사체를 생산하는 OCT-4^{+} 태반 세포가 기타 다른 태반 세포로부터 단리된다.

[0096] 또다른 실시태양에서, 태반 세포, 예를 들어, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 콜로니 형성 단위 분석법에 의해 확인 및 특징 규명될 수 있다. 콜로니 형성 단위 분석법은 당업계에 통상적으로 공지되어 있다.

[0097] 태반 관류액 또는 관류액 세포를 생육성, 증식능 및 수명에 대해 당업계에 공지된 표준 기법, 예로서, 트립판 블루 배제 분석법, 플루오레세인 디아세테이트 흡수 분석법, 요오드화프로피듐 흡수 분석법 (생육성 평가용); 및 티미딘 흡수 분석법, MTT 세포 증식 분석법 (증식 평가용)을 사용하여 평가할 수 있다. 수명은 연장 배양시 개체수 배가의 최대값을 결정하는 것과 같은 당업계에 주지된 방법에 의해 결정될 수 있다 .

[0098] 당업계에 공지된 기타 다른 기법, 예를 들어, 원하는 세포의 선택적 성장 (양성 선별), 원치 않는 세포의 선택적 파괴 (음성 선별); 예를 들어, 대두 응집소와의 혼합형 군집 내에서의 차별적인 세포 응집성을 기초로 하는 분리; 냉동-해동 절차; 여과; 통상적 및 구역 원심분리; 원심분리성 정화 (카운터-스트리밍 (counter-streaming) 원심 분리); 단위 중량 분리; 역류 분배(countercurrent distribution); 전기 영동 등을 사용하여 태반 줄기 세포가 다른 태반 세포로부터 또한 단리될 수 있다.

[0099] 5.3 부착성 태반 줄기 세포

[0100] 부착성 태반 줄기 세포는 조직 배양 기판에 부착하고 비-태반 세포 유형으로 분화하는 능력이 있는, 태반 또는 그의 일부분으로부터 수득가능한 줄기 세포이다. 부착성 태반 줄기 세포의 기원은 태아 또는 모체일 수 있다 (즉, 각각 태아 또는 모체의 유전자형을 가질 수 있다). 부착성 태반 줄기 세포 군집, 또는 태반 줄기 세포를 포함하는 세포 군집의 기원은 단독으로 태아 또는 모체인 태반 줄기 세포를 포함할 수 있거나, 또는 태아 및 모체 기원 양쪽 모두의 태반 줄기 세포의 혼합형 군집을 포함할 수 있다. 태반 줄기 세포, 및 태반 줄기 세포를 포함하는 세포 군집은 하기 논의되는 형태학적, 마커 및 배양 특징에 의해 확인 및 선별될 수 있다. 본원에 기술되어 있는 조성물 및 방법에서 사용될 수 있는 부착성 태반 줄기 세포, 및 상기 세포를 수득하고 배양하는 방법은 미국 특허 번호 제7,045,148호; 제7,255,879호; 제7,311,904호; 및 제7,311,905호; 및 미국 출원 공개 번호 제2007/0275362호 및 제2008/0032401호 (상기 문헌의 개시 내용 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있다.

[0101] 5.3.1 물리적 및 형태학적 특징

[0102] 본원에서 제공하는 조성물 및 방법에서 사용될 수 있는 부착성 태반 줄기 세포는 1차 배양물 또는 세포 배양물에서 배양될 때, 조직 배양 기판, 예를 들어, 조직 배양 용기 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱)에 부착한다. 배양물 중의 부착성 태반 줄기 세포는 일반적으로 섬유모세포양의 성상 외관을 나타내고, 다수의 세포질 돌기가 중앙 세포체로부터 확장된다. 그러나, 부착성 태반 줄기 세포는 섬유모세포보다 더 많은 수의 상기 돌기를 나타내기 때문에 부착성 태반 줄기 세포는 동일한 조건하에 배양된 섬유모세포와는 형태학적으로 구별될 수 있다. 형태학적으로, 부착성 태반 줄기 세포는 또한 배양물 중에서 더욱 둥글거나 자갈형인 형태를 일반적으로 나타내는 조혈 줄기 세포와도 구별될 수 있다.

[0103] 5.3.2 세포 표면, 분자성 및 유전학적 마커

[0104] 단리된 부착성 태반 줄기 세포, 및 부착성 태반 줄기 세포 군집은 줄기 세포 또는 줄기 세포를 포함하는 세포 군집을 확인 및/또는 단리시키는데 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현한다. 부착성 태반 줄기 세포, 및 줄기 세포 군집 (즉, 2가지 이상의 태반 줄기 세포)은 태반 또는 그의 임의의 일부분 (예를 들어, 양막, 융모막, 태반엽 등)으로부터 직접 수득된 줄기 세포 및 줄기 세포-함유 세포 군집을 포함한다.

[0105] 부착성 태반 줄기 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, CD200, HLA-G, 및/또는 OCT-4를 발현하지만, CD34, CD38, 또는 CD45는 발현하지 않는다. 태반 줄기 세포는 또한 HLA-ABC (MHC-1) 및 HLA-DR도 발현할 수 있다.

[0106] 하나의 실시태양에서, 단리된 부착성 태반 줄기 세포는 $CD200^+$ 또는 $HLA\text{-}G^+$이다. 구체적인 실시태양에서, 줄기 세포는 $CD200^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 $CD200^+$ 또는 $HLA\text{-}G^+$ 줄기 세포는 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하의, 줄기 세포를 포함하는 태반 세포 군집에서의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다.

[0107] 또다른 실시태양에서, 단리된 부착성 태반 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $HLA\text{-}G^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$이고, 줄기 세포를 포함하는 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우, 상기 군집에서의 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다.

[0108] 또다른 실시태양에서, 단리된 부착성 태반 줄기 세포는 $CD200^+$ 및 $OCT\text{-}4^+$이다. 구체적인 실시태양에서, 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $HLA\text{-}G^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 줄기 세포는 줄기 세포를 포함하는 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우, 상기 군집에 의한 하나 이상의 배양체-유사체의 생산을 촉진시킨다.

[0109] 또다른 실시태양에서, 단리된 부착성 태반 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $OCT\text{-}4^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ 및 $CD200^+$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 상기 줄기 세포를 포함하는 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우, 상기 군집에서의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다.

[0110] 또다른 실시태양에서, 단리된 부착성 태반 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이고, 상기 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우, 상기 군집에서의 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $OCT4^+$이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이

다.

[0111] 또다른 실시태양에서, 단리된 부착성 태반 줄기 세포는 OCT-4^{+}이고, 상기 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포 군집이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우, 상기 군집에서의 하나 이상의 배양체-유사체의 형성을 촉진시킨다. 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD73^{+} 및 CD105^{+}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD34^{-}, CD38^{-}, 또는 CD45^{-}이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD200^{+}이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 CD73^{+}, CD105^{+}, CD200^{+}, CD34^{-}, CD38^{-}, 및 CD45^{-}이다.

[0112] 부착성 태반 줄기 세포는 효소 분해에 의해, 또는 관류, 예를 들어, 상기 기술된 바와 같은 포유동물 태반 관류에 의해 수득될 수 있다. 구체적인 실시태양에서, 관류 용액은 배꼽 정맥을 통과하게 되고, 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 배꼽 동맥을 통과하게 되고, 배꼽 정맥으로부터 수집된다. 부착성 태반 줄기 세포의 기원은 실질적으로 전적으로 태아일 수 있다; 즉, 예를 들어, 군집 내의 태반 줄기 세포 중 90%, 95%, 99%, 또는 99.5%를 초과하는 세포의 기원은 태아이다. 태반 조직을 효소적으로 분해하여 부착성 태반 줄기 세포를 수득한 것은 미국 특허 출원 공개 번호 제2007/0275362호 (그의 개시 내용 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.

[0113] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 골수-유래 중간엽 줄기 세포에 비하여 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ATRS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, 또는 상기 중 임의의 것의 조합인 하나 이상의 유전자를 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하는데, 여기서, 상기 부착성 태반 줄기 세포와 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 등가의 등가의 조건하에서 성장시킨 것이다. 구체적인 실시태양에서, 태반 줄기 세포-특이 또는 제대 줄기 세포-특이 유전자는 CD200이다.

[0114] **5.4** 태반 관류액 세포의 배양

[0115] **5.4.1** 배양 배지

[0116] 단리된 태반 세포, 예를 들어, 관류액 세포, 또는 그로부터 수득된 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포, 또는 태반 줄기 세포 군집, 또는 태반 줄기 세포에서 생긴 세포 또는 태반 조직을 사용하여 세포 배양을 시작하거나 시딩할 수 있다. 일반적으로 세포는 세포외 매트릭스 또는 리간드, 예로서, 라미닌, 콜라겐 (예를 들어, 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴, 및 세포외 막 단백질 (예를 들어, 마트리겔(MATRIGEL) (매사추세츠주 베드퍼드 소재의 BD 디스커버리 랩웨어(BD Discovery Labware)))로 코팅되거나 코팅되지 않은, 무균성 조직 배양 베쓸로 옮겨진다.

[0117] 태반 세포는 당업계에서 세포, 예를 들어, 줄기 세포의 배양에 허용가능한 것으로 인식되는 임의의 배지 및 임의의 조건하에서 배양될 수 있다. 바람직하게, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 태반 관류액 세포, 또는 태반 줄기 세포는, 예를 들어, ITS (인슐린-트랜스페린-셀레늄), LA+BSA (리놀레산-우혈청 알부민), 덱스트로스, L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-1, 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM-LG (둘베코스(Dulbecco's) 변형 필수 배지, 저 글루코스)/MCDB 201 (병아리 섬유모세포 기초 배지); 10% 우태아 혈청 (FBS)을 포함하는 DMEM-HG (고 글루코스); 15% FBS를 포함하는 DMEM-HG; 10% FBS, 10% 말 혈청, 및 하이드로코르티손을 포함하는 IMDM (이스코브스(Iscove's) 변형 둘베코스 배지); 10% FBS, EGF 및 헤파린을 포함하는 M199; 10% FBS, 글루타맥스(GLUTAMAX)™ 및 젠타마이신을 포함하는 α-MEM (최소 필수 배지); 10% FBS, 글루타맥스™ 및 젠타마이신을 포함하는 DMEM 등에서 배양될 수 있다. 바람직한 배지는 2% FBS, ITS, LA+BSA, 덱스트로스, L-아스코르브산, PDGF, EGF, 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM-LG/MCDB-201이다.

[0118] 태반 세포를 배양하는데 사용될 수 있는 기타 다른 배지로는 DMEM (고 또는 저 글루코스), 이글스(Eagle's) 기초 배지, 햄스(Ham's) F10 배지 (F10), 햄스 F-12 배지 (F12), 이스코브스 변형 둘베코스 배지, 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM), 라이보비츠(Liebovitz) L-15 배지, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, 개선된 DMEM (기브코(Gibco)), DMEM/MCDB201 (시그마), 및 셀-그로 프리(CELL-GRO FREE)를 포함한다.

[0119] 예를 들면, 혈청 (예를 들어, 우태아 혈청 (FBS), 바람직하게는 약 2-15% (v/v); 말(equine) (말(horse)) 혈청 (ES); 인간 혈청 (HS)); 베타-머캅토에탄올 (BME), 바람직하게는 약 0.001% (v/v); 하나 이상의 성장 인자, 예

를 들어, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 표피 성장 인자 (EGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1), 백혈병 저해 인자 (LIF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 및 에리트로포이에틴 (EPO); L-발린을 비롯한 아미노산; 및 미생물 오염을 제어하기 위한 하나 이상의 항생제 및/또는 항진균제, 예를 들어, 페니실린 G, 스트렙토마이신 황산염, 암포테리신 B, 젠타마이신, 및 니스타틴을 비롯한, 하나 이상의 성분이 단독으로 또는 함께 조합되어 배양 배지를 보충할 수 있다.

[0120] 태반 관류액 또는 관류액 세포는 표준 조직 배양 조건에서, 예를 들어, 조직 배양 접시 또는 다중웰 플레이트에서 배양될 수 있다. 태반 관류액 또는 관류액 세포는 또한 현적(hanging drop) 방법을 사용하여 배양될 수 있다. 이러한 방법에서, 태반 줄기 세포는 약 5 mL의 배지 1mL당 약 1 x 10^4개의 세포로 현탁되고, 하나 이상의 배지 액적이 조직 배양 용기, 예를 들어, 100 mL 페트리(Petri) 접시의 뚜껑 안쪽에 놓이게 된다. 액적은, 예를 들어, 단일 액적이거나, 또는 다수의 액적일 수 있다 (예를 들어, 다채널 피펫터(multichannel pipetter)로부터 것). 뚜껑을 조심스럽게 뒤집고, 다량의 액체, 예를 들어, 접시 대기 중의 수분 함량을 유지하는데 충분한 무균성 PBS를 함유하는 접시 바닥 상부에 놓고, 줄기 세포를 배양한다.

[0121] 5.4.2 태반 세포의 확장 및 증식

[0122] 단리된 태반 세포, 예를 들어, 관류액 또는 관류액 세포 또는 줄기 세포, 또는 단리된 상기 세포의 군집 (예를 들어, 생체내에서 줄기 세포 또는 줄기 세포 군집과 정상적으로 회합된 태반 세포의 적어도 약 50%로부터 분리된 줄기 세포 또는 줄기 세포 군집)은 시험관내에서 증식 및 확장될 수 있다. 예를 들면, 태반 세포 군집은 조직 배양 용기, 예를 들어, 접시, 플라스크, 다중웰 플레이트 등에서 줄기 세포가 70-90% 융합성을 나타내는 정도로 증식하는데 충분한 시간 동안, 즉, 세포 및 그의 자손이 조직 배양 용기의 배양 표면적의 70-90%를 차지할 때까지 배양될 수 있다.

[0123] 태반 줄기 세포는 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 베쓸에 시딩될 수 있다. 예를 들면, 세포는 저밀도 (예를 들어, 약 1,000개 내지 약 5,000개의 세포/㎠) 내지 고밀도 (예를 들어, 약 50,000개 이상의 세포/㎠)로 시딩될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 세포는 대기 중 약 0 내지 약 5 부피%의 CO_2에서 배양된다. 몇몇 바람직한 실시태양에서, 세포는 대기 중 약 2 내지 약 25%의 O_2, 바람직하게는 대기 중 약 5 내지 약 20%의 O_2에서 배양된다. 바람직하게 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃, 바람직하게는 37℃에서 배양된다. 바람직하게 세포는 인큐베이터에서 배양된다. 배양 배지는 정적형일 수 있거나, 또는 예를 들면, 생물반응기를 사용하여 진탕될 수 있다. 태반 줄기 세포는 (예를 들어, 글루타티온, 아스코르브산, 카탈라제, 토코페롤, N-아세틸시스테인 등의 첨가로) 낮은 산화성 스트레스하에서 성장시키는 것이 바람직하다.

[0124] 일단 70%-90%의 융합성을 나타내면, 세포를 계대시킬 수 있다. 예를 들어, 세포를 당업계에 주지된 기술을 사용하여 효소로 처리하고, 예를 들어, 트립신처리하여, 조직 배양 표면으로부터 세포를 분리할 수 있다. 세포를 피펫팅에 의해 제거하고 세포를 계수한 후, 약 20,000-100,000개의 줄기 세포, 바람직하게는 약 50,000개의 줄기 세포를, 신선한 배양 배지를 함유하는 새로운 배양 용기로 계대시킨다. 전형적으로, 새로운 배지는 줄기 세포가 제거된 동일한 유형의 배지이다. 본원에서 제공하는 방법 및 조성물에서 유용한 부착성 태반 줄기 세포는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 또는 20회 이상 계대된 것일 수 있다.

[0125] 5.4.3 태반 세포 군집

[0126] 태반 관류액, 또는 태반 관류액 세포는 부착성 태반 줄기 세포, $CD34^+$ 태반 세포 (예를 들어, $CD34^+$ 태반 내피 기원 세포, 태반 이외의 공급원 (예를 들어, 예로서, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 골수 등)으로부터의 $CD34^+$ 세포, 줄기 세포가 아닌 태반 세포, 또는 태반 세포가 아닌 세포로 보충될 수 있다.

[0127] 단리된 태반 세포 군집, 예를 들어, 관류액 또는 태반 관류액 세포는 비-줄기 세포 또는 비-태반 세포의 하나 이상의 군집과 조합될 수 있다. 예를 들면, 단리된 태반 세포 군집은 혈액 (예를 들어, 태반 혈액 또는 제대혈), 혈액-유래 줄기 세포 (예를 들어, 태반 혈액 또는 제대혈로부터 유래된 줄기 세포), 혈액-유래 유핵 세포 군집, 골수-유래 중간엽 세포, 골-유래 줄기 세포 군집, 미정제 골수, 성체 (체세포) 줄기 세포, 조직 내에 함유된 줄기 세포의 군집, 배양된 줄기 세포, 완전히 분화된 세포의 군집 (예를 들어, 연골세포, 섬유모세포, 양막 세포, 골모 세포, 근육 세포, 심근 세포 등) 등과 조합될 수 있다. 단리된 태반 세포 군집 내의 세포는 각 군집 내의 전체 유핵 세포의 갯수와 비교하여 약 100,000,000:1, 50,000,000:1, 20,000,000:1, 10,000,000:1, 5,000,000:1, 2,000,000:1, 1,000,000:1, 500,000:1, 200,000:1, 100,000:1, 50,000:1, 20,000:1, 10,000:1, 5,000:1, 2,000:1, 1,000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1;

1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1,000; 1:2,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:50,000; 1:100,000; 1:500,000; 1:1,000,000; 1:2,000,000; 1:5,000,000; 1:10,000,000; 1:20,000,000; 1:50,000,000; 또는 약 1:100,000,000의 비율로 또다른 유형의 세포 다수와 조합될 수 있다. 단리된 태반 세포 군집 내의 세포는 또한 다수의 세포 유형의 다수의 세포와 조합될 수 있다.

[0128] 한 경우에서, 단리된 태반 관류액 또는 관류액 세포 군집은 다수의 $CD34^+$ 세포와 조합된다. 그러한 $CD34^+$ 세포는, 예를 들면, 공정처리되지 않은 태반혈, 제대혈 또는 말초 혈액; 태반혈, 제대혈 또는 말초 혈액로부터의 전체 유핵 세포; 태반혈, 제대혈 또는 말초 혈액로부터의 단리된 $CD34^+$ 세포 군집; 공정처리되지 않은 골수; 골수로부터의 전체 유핵 세포; 골수로부터의 단리된 $CD34^+$ 세포 군집 등 내에 함유되어 있을 수 있다. 구체적인 실시태양에서, 조혈 줄기 세포는 $CD34^+$ 태반 내피 기원 세포이다.

[0129] 5.5 태반 세포 은행 제조

[0130] 태반 관류액, 및 태반 관류액 세포를 세포 은행에 보관할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 인간 관류액 또는 관류액 세포이다. 관류액 또는 관류액 세포는 단위로, 예를 들면, 단일의 태반, 또는 단일 태반의 단일 관류로부터 수집된 전체 관류액 또는 세포로 보관될 수 있다. 다수의 관류, 또는 다수의 태반으로부터의 관류액, 또는 관류액 세포는 단위로 조합될 수 있다.

[0131] 산후 태반으로부터의 세포, 예를 들어, 줄기 세포, 태반 관류액 세포, 또는 그의 조합을 다수의 상이한 방식으로 배양하여, 태반 줄기 세포로 이루어진 로트 세트, 예를 들어, 개별적으로 투여가능한 용량의 태반 줄기 세포로 이루어진 세트를 제조할 수 있다. 그러한 로트는 예를 들면, 태반 관류액 또는 효소 분해된 태반 조직으로부터의 줄기 세포로부터 수득할 수 있다. 다수의 태반으로부터 수득된, 태반 세포로 이루어진 로트 세트는, 예를 들어, 장기 보관을 위해 태반 세포의 은행에 배열될 수 있다. 일반적으로, 부착성 줄기 세포는 태반 물질의 초기 배양물로부터 수득되어 시드 배양물을 형성하고, 이는 제어된 조건하에 확장되어 대략 같은 배가수의 세포의 군집을 형성한다. 로트는 바람직하게는 단일 태반의 조직으로부터 유래되지만, 다수의 태반 조직으로부터 유래될 수 있다.

[0132] 하나의 실시태양에서, 태반 세포 로트는 하기와 같이 수득된다. 하나 이상의 태반을 관류시켜, 바람직하게는, 태반 혈관계만을 통해, 바람직하게는 제대혈이 배수된 태반으로부터 태반 관류액 세포를 수득하고, 관류시켜 잔류 혈액을 제거하고, 생성된 관류액 중의 세포를 세포를 원심분리에 의해 수집하고, 적혈구를 제거한다. 이들 세포를 수집하고, 간편한 부피의 배양 배지에 재현탁시키고, 이를 시초 계대 세포로서 정의한다.

[0133] 시초 계대 세포를 사용하여 확장 배양물을 시딩한다. 확장 배양물은 별개의 세포 배양 기구, 예를 들어, 셀 팩토리(Cell Factory) (NUNC™)의 임의의 배열일 수 있다. 시초 계대 배양물 중의 세포들은 확장 배양물에 예를 들어, 1×10^3, 2×10^3, 3×10^3, 4×10^3, 5×10^3, 6×10^3, 7×10^3, 8×10^3, 9×10^3, 1×10^4, 1×10^4, 2×10^4, 3×10^4, 4×10^4, 5×10^4, 6×10^4, 7×10^4, 8×10^4, 9×10^4, 또는 10×10^4개의 줄기 세포가 시딩될 수 있도록 임의의 정도로 세분될 수 있다. 바람직하게는, 약 2×10^4개 내지 약 3×10^4개의 계대 0 세포가 각각의 확장 배양물에 시딩하는데 사용된다. 확장 배양물의 수는 시초 계대 세포의 수에 따라 달라질 수 있고, 줄기 세포가 수득된 특정 태반(들)에 따라 수가 더 크거나 작을 수 있다.

[0134] 배양물 내의 세포의 밀도가 특정 값, 예를 들어, 약 1×10^5개의 세포/㎠에 도달할 때까지 확장 배양물을 성장시킨다. 이 시점에서 세포를 수집 및 냉동보존할 수 있거나, 또는 상기 기술된 바와 같이 새로운 확장 배양물로 계대시킬 수 있다. 세포는 사용 이전에 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20회에 걸쳐 계대시킬 수 있다. 바람직하게는 개체수 배가의 누적 횟수의 기록이 확장 배양(들) 동안 유지된다. 시초 계대 배양물로부터의 세포는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 또는 40회, 또는 60회 배가까지 확장될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 세포의 군집을 개별적인 용량으로 나누기 전의 개체수 배가 횟수는 약 15 내지 약 30회, 바람직하게는 약 20회 배가이다. 세포는 확장 공정 전반에 걸쳐 연속적으로 배양될 수 있거나, 또는 확장 동안 1회 이상 냉동될 수 있다.

[0135] 개별적인 용량에 사용될 세포가 추후의 사용을 위해 동결, 예를 들어, 냉동보존될 수 있다. 개별적인 용량은, 예를 들어, 1 mL당 약 1백만 내지 약 1억개의 세포를 포함할 수 있고, 전체적으로는 약 10^6 내지 약 10^9개의 세

포를 포함할 수 있다.

[0136] 따라서, 하나의 실시태양에서, 다수의 제1 개체수 배가를 위해 인간 산후 태반으로부터 1차 배양 태반 줄기 세포를 확장시키는 단계; 상기 태반 줄기 세포를 냉동보존하여 마스터 세포 은행(Master Cell Bank)을 형성하는 단계; 다수의 제2 개체수 배가를 위해 마스터 세포 은행으로부터 다수의 태반 줄기 세포를 확장시키는 단계; 상기 태반 줄기 세포를 냉동보존하여 작업용 세포 은행(Working Cell Bank)을 형성하는 단계; 다수의 제3 개체수 배가를 위해 작업용 세포 은행으로부터 다수의 태반 줄기 세포를 확장시키는 단계; 및 상기 태반 줄기 세포를 개별적인 용량으로 냉동보존하되, 여기서, 상기 개별적인 용량들이 총괄적으로 태반 줄기 세포 은행을 구성하는 것인 단계를 포함하는 방법에 의해 태반 줄기 세포 은행이 제조될 수 있다. 하나의 구체적인 실시태양에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^4 내지 약 10^5개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^5 내지 약 10^6개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^6 내지 약 10^7개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^7 내지 약 10^8개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^8 내지 약 10^9개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^9 내지 약 10^{10}개의 태반 줄기 세포를 포함한다.

[0137] 바람직한 실시태양에서, 태반이 수득되는 기증자 (예를 들어, 모체)가 적어도 하나의 병원체에 대해 시험된다. 시험된 병원체에 대해 모체가 양성이면, 태반으로부터의 전체 로트를 폐기한다. 그러한 시험은 계대 0 세포의 수립 전 또는 후, 또는 확장 배양 동안을 비롯한, 태반 줄기 세포 로트 생산 동안의 임의의 시점에 실시될 수 있다. 존재에 대해 시험되는 병원체로는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, 인간 면역결핍 바이러스 (I형 및 II형), 사이토메갈로바이러스, 헤르페스바이러스 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0138] 5.6 태반 세포의 보존

[0139] 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 부착성 태반 줄기 세포 및/또는 $CD34^+$ 태반 세포와의 조합물은 보존될 수 있고, 즉, 장기 보관을 허용하는 조건, 또는 예를 들어, 아포프토시스 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 저해시키는 조건하에 놓일 수 있다.

[0140] 관련된 미국 출원 공개 번호 제2007/0190042호 (발명의 명칭 "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs") (상기 문헌은 개시 내용 전문이 본원에서 참고로 인용된다)에 기재되어 있는 바와 같이, 세포는 예를 들어, 아포프토시스 저해제, 괴사 저해제 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 조성물을 사용하여 보존될 수 있다.

[0141] 하나의 실시태양에서, 태반 세포 군집은, 상기 세포 군집을 예를 들어, 에멀전 중 또는 별개의 상 중 아포프토시스 저해제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉시키되, 여기서, 상기 아포프토시스 저해제는 아포프토시스 저해제와 접촉되지 않은 세포 군집과 비교하여, 줄기 세포 군집에서 아포프토시스를 감소시키거나 방지하는데 충분한 양으로, 그리고 그에 충분한 시간 동안 존재하는 것인 단계에 의해서 보존될 수 있다. 다양한 실시태양에서, 상기 아포프토시스 저해제는 카스파제 저해제 또는 JNK 저해제이다. 또다른 실시태양에서, 세포 수집 조성물은 추가로 유화제, 예를 들어, 레시틴을 포함한다. 또다른 실시태양에서, 상기 아포프토시스 저해제 및 상기 퍼플루오로카본은 세포에 접촉하는 시점에 약 0℃ 내지 약 25℃ 사이이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 아포프토시스 저해제 및 상기 퍼플루오로카본은 세포에 접촉하는 시점에 약 2℃ 내지 10℃ 사이, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃ 사이이다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 상기 세포 군집의 수송 도중에 실시된다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 접촉이 상기 세포 군집의 동결 및 해동 동안 실시된다. 아포프토시스 저해제는 장기-보존 화합물, 예로서, 하이드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, UW 용액 (미국 특허 번호 제4,798,824호에 기재되어 있는 것; 비아스판(ViaSpan)으로도 공지되어 있다; 또한, 문헌 [Southard et al, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)]도 참조) 또는 미국 특허 번호 제5,552,267호 (스턴(Stern) 등)에 기재되어 있는 용액, 또는 그의 조합물과 조합될 수 있다 (상기 문헌들의 개시 내용은 본원에서 참고로 인용된다).

[0142] 본 발명의 또다른 실시태양에서, 태반 세포는, 관류 동안 아포프토시스 저해제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물, 장기-보존 화합물, 또는 그의 조합물과 접촉하게 된다. 또다른 실시태양에서, 상기 세포는 조직 파괴 공정, 예를 들어, 효소 분해 동안 접촉하게 된다. 또다른 실시태양에서, 태반 세포는 관

류에 의한 수집 후에, 또는 조직 파괴, 예를 들어, 효소 분해에 의한 수집 후에 상기 세포 수집 화합물과 접촉하게 된다.

[0143] 전형적으로, 태반 세포 수집, 강화 및 단리 동안, 저산소증 및 기계적 스트레스로 인한 세포 스트레스를 최소화시키거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 방법의 또다른 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 태반 줄기 세포, 또는 줄기 세포 군집은 상기 보존 동안 6시간 미만으로 수집, 강화 또는 단리 동안의 저산소성 조건에 노출되되, 여기서, 저산소성 조건은 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소의 농도이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 세포 군집은 상기 보존 동안 2시간 미만으로 상기 저산소성 조건에 노출된다. 또다른 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 세포 군집은, 수집, 강화 또는 단리 동안, 상기 저산소성 조건에 1시간 미만 또는 30분 미만 동안 노출되거나, 또는 저산소성 조건에 노출되지 않는다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 세포 군집은 수집, 강화 또는 단리 동안 전단 스트레스에 노출되지 않는다.

[0144] 태반 관류액 및 관류액 세포는 냉동보존될 수 있고, 예를 들어, 소형 용기, 예를 들어, 앰플 내의 냉동보존 배지에 냉동보존될 수 있다. 적합한 냉동보존 배지로는 예를 들어, 성장 배지, 또는 세포 동결 배지, 예를 들면, 상업적으로 이용가능한 세포 동결 배지, 예를 들어, C2695, C2639 또는 C6039 (시그마)를 비롯한 배양 배지를 포함한다. 냉동보존 배지는 바람직하게는 DMSO (디메틸설폭시드)를 예를 들어, 약 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 냉동보존 배지는 추가적인 제제, 예를 들어, 메틸셀룰로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 바람직하게 태반 줄기 세포는 냉동보존 동안 약 1℃/분으로 냉각된다. 바람직한 냉동보존 온도는 약 -80℃ 내지 약 -180℃, 바람직하게는 약 -125℃ 내지 약 -140℃이다. 냉동보존된 세포는 사용하기 위해 해동하기 전 액체 질소로 옮겨질 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 예를 들면, 일단 앰플이 약 -90℃에 도달하면, 이를 액체 질소 보관 구역으로 옮긴다. 바람직하게 냉동보존된 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도, 바람직하게는 약 37℃의 온도에서 해동된다.

[0145] 5.7 태반 세포의 용도

[0146] 5.7.1 태반 세포 군집

[0147] 본원에서는 심장 또는 혈관 질환, 질병 또는 기능부족을 앓는 개체에게 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포, 및 상기와 기타 다른 세포, 예를 들어, 내피 기원 세포, 조혈 줄기 세포 또는 제대혈과의 조합물을 투여하는 것을 포함하는, 심장 또는 혈관 질환, 질병 또는 기능부족을 앓는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 바, "치료"는 심장 또는 혈관 질환, 질병, 병태 또는 기능부족, 또는 그의 임의의 파라미터 또는 증상의 치유, 교정, 개선, 중증도 축소 또는 경시적 감소를 포함한다. 다양한 실시태양에서, 상기 질환, 질병, 병태 또는 기능부족은 말초 혈관 질환, 급성 또는 만성 심근경색증, 심근병증, 울혈성 또는 만성 심부전, 심혈관 허혈, 고혈압성 폐 혈관 질환, 말초 동맥 질환, 또는 류마티스 심장병이다.

[0148] 태반 관류액 세포, 및 태반 관류액 세포 군집, 또는 그로부터 수득된 줄기 세포는 줄기 세포, 또는 줄기 세포로부터 분화된 세포를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 제제에서 생체외에서든 생체내에서든 특정의 세포 유형으로 유도 분화될 수 있다. 예를 들면, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 손상된 장기 내로,그리고 생체내에서의 장기 신생과 손상 수복을 위해 주사될 수 있다. 그러한 손상은 예를 들어, 동맥 또는 정맥 차단, 경색증, 허혈 등에 의해 유발될 수 있다.

[0149] 태반 관류액 및 관류액 세포는 줄기 세포가 분화할 수 있도록 하는 조건하에서 배양되지 않고 투여될 수 있다. 별법으로, 관류액 또는 관류액 세포는 예를 들어, 투여전 약 1-20일 동안 예를 들어, 혈관형성 또는 혈관성 배지 중에서 배양될 수 있다. 특정 실시태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 단리되고, 매트릭스 상에 시딩된 후, 예를 들어 약 1-20일 동안 혈관형성 또는 혈관성 배지 중에서 배양될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 예를 들어 약 1-20일 동안 예를 들어 혈관형성 또는 혈관성 배지 중에서 배양된 후, 매트릭스 상에 시딩되고, 이어서 예를 들어 약 1-20일 동안 본원에 기술된 골발생성 배지 중에서 배양될 수 있다.

[0150] 태반 관류액 또는 관류액 세포는 단독으로, 또는 줄기 세포 또는 기원 세포 군집, 예를 들어, 태반 줄기 세포와 함께 조합되어 시험관내 또는 생체내에서의 조직 또는 장기 생산에 사용될 수 있다. 태반으로부터 수득된 세포, 예를 들어, 관류액, 관류액 세포, 태반 줄기 세포 또는 기원 세포를 사용하여 매트릭스에 시딩할 수 있고, 이어서, 세포가 분화되고 매트릭스에 존재할 수 있도록 하거나, 또는 이를 허용하는 조건하에 배양할 수 있다. 본원에서 제공된 방법에 의해 수득된 조직 및 장기는 연구 및 치료 목적을 비롯한, 다양한 목적에 사용

될 수 있다.

[0151] 또다른 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 적합 및 부적합 HLA 유형 조혈 이식편을 비롯한, 자가 및 동종 이식편에 사용될 수 있다. 동종 조혈 이식편으로서의 태반 관류액 및/또는 관류액 세포의 용도에 관한 하나의 실시태양에서, 숙주는 기증자 세포의 면역학적 거부를 감소시키도록 또는 면역내성이 생성되도록 치료된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 제5,800,539호 및 제5,806,529호 참조). 또다른 실시태양에서, 숙주는 면역학적 거부를 감소시키도록 또는 면역내성이 생성되도록 치료되지 않는다.

[0152] 태반 관류액 또는 관류액 세포는 단독으로, 또는 하나 이상의 기타 다른 줄기 세포 군집과 함께 조합되어 치료용 이식 프로토콜에서, 예를 들어, 간, 췌장, 신장, 폐, 신경계, 근육계, 골, 골수, 흉선, 지라, 점막 조직, 생식샘, 또는 모발의 줄기 세포 또는 기원 세포를 증대시키거나 대체하기 위해 사용될 수 있다. 추가로, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 기원 세포가 전형적으로 사용될 수 있는 치료용 또는 연구용 프로토콜에서 특정 부류의 기원 세포 (예를 들어, 연골세포, 간세포, 조혈 세포, 췌장 실질 세포, 신경모세포, 근육 기원 세포 등) 대신 사용될 수 있다.

[0153] 태반 관류액 또는 관류액 세포는 예를 들어, 외상, 대사 장애 또는 질환으로부터 초래된 조직 및 장기에 대한 손상을 수복시키는데 사용될 수 있다. 그러한 실시태양에서, 질환의 결과로서 손상된 조직 또는 장기를 재생 또는 복원시키기 위해 환자에게 태반 관류액 또는 관류액 세포를 단독으로 또는 기타 다른 줄기 세포 또는 기원 세포 군집과 조합되어 투여될 수 있다.

[0154] 5.7.2 태반 관류액 또는 관류액 세포를 포함하는 조성물

[0155] 본원에서는 태반 관류액 또는 관류액 세포 또는 그로부터의 생체분자를 포함하거나, 그로부터 유래된 조성물을 제공한다. 태반 관류액 또는 관류액 세포는 예를 들어, 연구용 또는 치료법용의 임의의 생리학적으로 허용가능하거나 의학적으로 허용가능한 화합물, 조성물 또는 장치와 조합될 수 있다.

[0156] 5.7.2.1 *냉동보존된 태반 관류액 또는 관류액 세포*

[0157] 본원에 기술된 태반 관류액 또는 관류액 세포는 추후의 사용을 위해 보존될 수 있고, 예를 들어, 냉동보존될 수 있다. 세포, 예로서, 줄기 세포의 냉동보존 방법은 당업계에 주지되어 있다. 태반 줄기 세포 군집은 개체에게 용이하게 투여될 수 있는 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본원에서는 의학적 용도로 사용하기에 적합한 용기 내에 함유된 태반 줄기 세포 군집을 제공한다. 그러한 용기는, 예를 들면, 무균성 플라스틱 백, 플라스크, 병, 또는 태반 줄기 세포 군집이 용이하게 분배될 수 있는 기타 다른 용기일 수 있다. 예를 들어, 용기는 혈액 백, 또는 수혜자에게 액체를 정맥내 투여하는데 적합한 기타 다른 의학적으로 허용가능한 플라스틱 백일 수 있다. 용기는 조합된 줄기 세포 군집이 냉동보존될 수 있도록 하는 용기가 바람직하다.

[0158] 냉동보존된 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 단일의 기증자 또는 다수의 기증자로부터 유래된 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 포함할 수 있다. 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 의도된 수혜자에 대해 완전 HLA-적합성이거나, 또는 부분적 또는 완전 HLA-부적합성일 수 있다.

[0159] 따라서, 하나의 실시태양에서, 본원에서는 용기내 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 냉동보존된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 용기는 백, 플라스크, 또는 병이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 백은 무균성 플라스틱 백이다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 백은 상기 태반 줄기 세포 군집의 정맥내 투여에 적합하거나, 이를 허용하거나, 또는 이를 용이하게 한다. 백은 태반 줄기 세포와 하나 이상의 기타 다른 용액, 예를 들어, 약물이 투여 이전 또는 투여 동안에 혼합될 수 있도록 서로 연결된 다중 공간 또는 구획을 포함할 수 있다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 조성물은 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포의 냉동보존을 촉진시키는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 생리학적으로 허용가능한 수성 용액 내에 함유된다. 더욱 구체적인 실시태양에서, 상기 생리학적으로 허용가능한 수성 용액은 0.9% NaCl 용액이다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포의 수혜자에 대해 HLA-적합성인 태반 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포의 수혜자에 대해 적어도 부분적으로 HLA-부적합성인 태반 세포를 포함한다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 다수의 기증자로부터 유래된다.

[0160] 5.7.2.2 *약제학적 조성물*

[0161] 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 생체내에서 사용하기 위한 약제학적 조성물로 제제화될 수 있다. 그러한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어, 염수 용액 또는 생체내 투여를 위한 기타 다른 허용되는 생리학적으로 허용가능한 용액 내에 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 포함한다. 본원에서 제공하는 약제학적 조성물은 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포 실시태양 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 태아 태반 세포, 모체 태반 세포, 또는 태아 및 모체 둘 모두의 태반 세포를 포함할 수 있다. 본원에서 제공하는 약제학적 조성물은 추가로 단일의 개체 또는 태반으로부터 또는 다수의 개체 또는 태반으로부터 수득된 태반 세포를 포함할 수 있다.

[0162] 본원에서 제공하는 약제학적 조성물은 임의 갯수의 태반 세포를 포함할 수 있다. 다양한 실시태양에서, 예를 들면, 태반 세포, 예를 들어, 관류액 세포의 단일의 단위 용량은 약, 적어도 또는 최대 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 태반 세포를 포함할 수 있다.

[0163] 세포는 예를 들어, 염수 용액, 예를 들면, 인산염 완충처리된 염수, 0.9% NaCl 용액 등과 같은 생리학적으로 허용가능한 용액 중에서 투여될 수 있다.

[0164] 본원에서 제공하는 약제학적 조성물은 50% 이상이 생육성 세포를 포함하는 것인 세포, 예를 들어, 태반 관류액 세포의 군집을 포함할 수 있다 (즉, 군집내 세포의 적어도 약 50%가 기능성이거나 살아있는 것이다). 바람직하게는, 군집내 세포의 적어도 약 60%가 생육성이다. 더욱 바람직하게, 약제학적 조성물 중 군집내 세포의 적어도 약 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%가 생육성이다.

[0165] 본원에서 제공하는 약제학적 조성물은 하나 이상의 화합물, 예를 들어, 생착을 촉진시키는 화합물 (예를 들어, 항-T-세포 수용체 항체, 면역억제제 등); 안정화제, 예로서, 알부민, 덱스트란 40, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 등을 포함할 수 있다.

[0166] 본원에서 제공하는 세포 군집은 개체에게, 예를 들면 수복 또는 증대를 필요로 하는 부위에 직접적으로 또는 간접적으로 외과적으로 이식될 수 있거나, 주사될 수 있거나, 전달될 수 있거나 (예를 들면, 카테터 또는 주사기를 통해서 이루어짐), 또는 기타 다른 방식으로 투여될 수 있다. 본원에서 제공하는 세포 군집, 또는 조성물, 예를 들어, 약제학적 조성물은 경구적으로, 비내로, 동맥내로, 비경구적으로, 정맥내로, 눈으로, 근육내로, 피하로, 복강내로, 뇌내로, 뇌실내로, 뇌혈관내로, 경막내로, 수조내로, 척수내로 및/또는 척수주위로 투여될 수 있다.

[0167] 5.7.2.3 *태반 세포 조절 배지*

[0168] 태반 관류액, 태반 관류액 세포, $CD34^+$ 태반 세포, 또는 그의 조합물, 예를 들면, 부착성 태반 줄기 세포와의 조합물은 조절 배지, 즉, 관류액 또는 세포에 의해 분비되거나, 배출된 하나 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 제조하는데 사용될 수 있다. 각종 실시태양에서, 조절 배지는 태반 세포가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상의 기간 동안 성장하였던 배지를 포함한다. 다른 실시태양에서, 조절 배지는 태반 세포가 적어도 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 융합성을 나타낼 때까지, 또는 100% 이하의 융합성을 나타낼 때까지 성장하였던 배지를 포함한다. 그러한 조절 배지는 태반 세포, 또는 또다른 종류의 세포, 예를 들어, 줄기 세포로 이루어진 별개의 군집 배양을 지속시키는데 사용될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 조절 배지는 태반 줄기 세포가 성체 세포 유형으로 분화된 배지를 포함한다. 또다른 실시태양에서, 조절 배지는 태반 관류액 세포 및 비-태반 줄기 세포가 배양된 배지를 포함한다.

[0169] *5.7.2.4 태반 세포를 포함하는 매트릭스*

[0170] 본원에서는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 포함하는 매트릭스, 하이드로겔, 스캐폴드 등을 추가로 제공한다.

[0171] 태반 세포, 예를 들어, 관류액 또는 관류액 세포를 천연 매트릭스, 예를 들어, 태반 생체물질, 예로서, 양막 물질 상에 시딩시킬 수 있다. 그러한 양막 물질은 예를 들어, 포유동물 태반으로부터 직접 절개된 양막; 고정 또는 열-처리된 양막, 실질적으로 건식 (즉, <20% H_2O) 양막, 융모막, 실질적으로 건식 융모막, 실질적으로 건식 양막 및 융모막 등일 수 있다. 태반 줄기 세포가 시딩될 수 있는 바람직한 태반 생체물질은 미국 출원 공개 번호 제2004/0048796호(하리리)에 기재되어 있다.

[0172] 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포를 예를 들어, 주사에 적합한 하이드로겔 용액에 현탁시킬 수 있다. 상기

조성물에 적합한 하이드로겔로는 자가-조립 펩티드, 예로서, RAD16을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 세포를 포함하는 하이드로겔 용액은, 예를 들어 주형 내에서, 세포가 내부에 분산되어 있는 이식용 매트릭스를 형성하도록 경화될 수 있다. 상기 매트릭스 내의 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 또한 이식 전에 세포가 유사분열적으로 확장되도록 배양될 수 있다. 하이드로겔은, 예를 들어, 물 분자를 포획하는 3차원 개방형-격자 구조를 생성하도록 공유 결합, 이온 결합 또는 수소 결합을 통해 가교되어 겔을 형성하는 유기 중합체 (천연 또는 합성)이다. 하이드로겔-형성 물질로는 다당류, 예로서, 알기네이트 및 그의 염, 펩티드, 폴리포스파진, 및 폴리아크릴레이트 (이온성으로 가교됨), 또는 블록 중합체, 예로서, 폴리에틸렌 옥시드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 (온도 또는 pH에 의해 가교됨)가 각각 포함된다. 몇몇 실시태양에서, 하이드로겔 또는 매트릭스는 생분해성이다.

[0173] 몇몇 실시태양에서, 제제는 계내 중합성 겔을 포함한다 (예를 들어, (미국 특허 출원 공개 번호 제2002/0022676호; 문헌 [Anseth et al., *J. Control Release*, 78(1-3):199-209 (2002)]; [Wang et al, *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003)]) 참조).

[0174] 몇몇 실시태양에서, 중합체는 수성 용액, 예로서, 물, 완충처링된 염 용액, 또는 전하를 띤 측쇄기가 있는 수성 알코올 용액, 또는 그의 1가 이온성 염에 적어도 부분적으로 가용성이다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측쇄기가 있는 중합체의 예는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 아크릴산과 메타크릴산의 공중합체, 폴리(비닐 아세테이트), 및 설폰화 중합체, 예로서, 설폰화 폴리스티렌이 있다. 아크릴산 및 메타크릴산 및 비닐 에테르 단량체 또는 중합체의 반응에 의해 형성된 산성 측쇄기가 있는 공중합체 또한 사용될 수 있다. 산성기의 예는 카르복실산기, 설폰산기, 할로겐화 (바람직하게는 플루오르화) 알코올기, 페놀성 OH기, 및 산성 OH기가 있다.

[0175] 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 3차원 프레임워크 또는 스캐폴드 상에 시딩되어 생체내로 이식될 수 있다. 그러한 프레임워크는 조직 형성을 자극하거나 또는 다른 방식으로 본원에서 제공하는 방법의 실행을 증강 또는 개선시키는 임의의 하나 이상의 성장 인자, 세포, 약물 또는 기타 다른 성분과 조합되어 이식될 수 있다.

[0176] 본원에서 제공하는 방법에서 사용될 수 있는 스캐폴드의 예로는 부직 매트, 다공성 포말체, 또는 자가-조립 펩티드를 포함한다. 부직 매트는 글리콜산 및 락트산의 합성 흡수성 공중합체 (예를 들어, PGA/PLA)로 구성된 섬유(바이크릴(VICRYL), 뉴저지주 소머빌 소재의 에티콘 인크.(Ethicon, Inc.))를 사용하여 형성될 수 있다. 동결-건조 또는 냉동건조와 같은 공정에 의해 형성된 것, 예를 들면, 폴리(ε-카프로락톤)/폴리(글리콜산) (PCL/PGA) 공중합체로 구성된 포말체 (예를 들어, 미국 특허 번호 제6,355,699호 참조) 또한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

[0177] 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 또한 모노-, 디-, 트리-, 알파-트리, 베타-트리, 및 테트라-인산칼슘, 하이드록시아파타이트, 플루오로아파타이트, 황산칼슘, 플루오르화칼슘, 산화칼슘, 탄산칼슘, 마그네슘 인산칼슘, 생물학적으로 활성인 유리, 예로서, 바이오글래스(BIOGLASS)®, 및 그의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는 생리학적으로 허용가능한 세라믹 물질 상에 시딩되거나 그와 접촉될 수 있다. 현재 상업적으로 이용가능한 다공성 생체적합성 세라믹 물질로는 서지본(SURGIBONE)® (캐나다 소재의 캔메디카 코포레이션(CanMedica Corp.)), 엔도본(ENDOBON)® (프랑스 소재의 머크 바이오메테리얼 프랑스(Merck Biomaterial France)), 세로스(CEROS)® (스위스 베틀라히 소재의 마티스 아게(Mathys, AG)), 및 무기질화된 콜라겐 골 이식 제품, 예로서, 힐로스(HEALOS)™ (매사추세츠주 레이언햄 소재의 드퓨이 인크.(DePuy, Inc.) 및 비토스(VITOSS)®, 라코스(RHAKOSS)™, 및 코르토스(CORTOSS)® (펜실베니아주 맬버른 소재의 오르토비타(Orthovita))를 포함한다. 프레임워크는 천연 및/또는 합성 물질의 혼합물, 혼화물 또는 복합물일 수 있다.

[0178] 또다른 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 예를 들어, 생체흡수성 물질, 예로서, PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 혼화물, 또는 하이알루론산으로부터 제조된 다섬유사로 구성될 수 있는 펠트 상에 시딩되거나 또는 그와 접촉될 수 있다.

[0179] 또다른 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 복합 구조물일 수 있는 포말체 스캐폴드 상에 시딩될 수 있다. 그러한 포말체 스캐폴드는 유용한 형상, 예로서, 복구, 대체 또는 증대시키고자 하는 본체 내의 특정 구조물의 일부분의 형상으로 성형될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 프레임워크는 세포 부착을 증강시키기 위해 태반 세포, 예를 들어, 태반 관류액 세포의 접종 이전에, 예를 들어, 0.1 M 아세트산으로 처리된 후, 폴리

리신, PBS, 및/또는 콜라겐에서 인큐베이션된다. 매트릭스의 외부 표면은, 예로서, 매트릭스의 플라즈마-코팅에 의해, 또는 하나 이상의 단백질 (예를 들어, 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유), 당단백질, 글리코스아미노글리칸 (예를 들어, 헤파린 황산염, 콘드로이틴-4-황산염, 콘드로이틴-6-황산염, 더마탄 황산염, 케라틴 황산염 등), 세포 매트릭스, 및/또는, 젤라틴, 알기네이트, 아가, 아가로스 및 식물 고무 등과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 기타 다른 물질의 첨가에 의해, 세포의 부착 또는 성장 및 조직의 분화를 개선시키기 위해 변형될 수 있다.

[0180] 몇몇 실시태양에서, 스캐폴드는 이를 비-혈전형성 성질을 띠도록 물질을 포함하거나 이러한 물질로 처리된다. 이러한 처리 및 물질은 또한 내피 성장, 이동, 및 세포외 매트릭스 침착을 촉진키기고 유지시킬 수 있다. 이러한 물질 및 처리의 예로는 천연 물질, 예로서, 기저막 단백질, 예로서, 라미닌 및 IV형 콜라겐, 합성 물질, 예로서, EPTFE, 및 분절형 폴리우레탄 실리콘, 예로서, 푸르스판(PURSPAN)™ (캘리포니아주 버클리 소재의 더 폴리머 테크놀로지 그룹, 인크(The Polymer Technology Group, Inc.))을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 스캐폴드는 또한 항-혈전제, 예로서, 헤파린을 포함할 수 있다; 또한 스캐폴드는 태반 관류액 또는 관류액 세포를 시딩하기 이전에 표면 전하가 변경되도록 처리될 수 있다 (예를 들어, 플라즈마로 코팅됨).

[0181] 하나의 실시태양에서, 태반 줄기 세포는 약 0.5 x 10^6 내지 약 8 x 10^6개의 세포/mL로 적합한 스캐폴드 상에 시딩될 수 있거나, 그와 접촉될 수 있다.

[0182] 5.7.3 불멸화 태반 세포주

[0183] 성장-촉진 유전자, 즉, 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성이 외부 인자에 의해 조절가능하도록, 적합한 조건하에서 형질감염된 세포의 성장을 촉진시키는 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 임의의 적합한 벡터로 형질감염시킴으로써 포유동물 태반 세포를 조건부로 불멸화시킬 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 성장-촉진 유전자는 v-myc, N-myc, c-myc, p53, SV40 대형 T 항원, 폴리오마 대형 T 항원, E1a 아데노바이러스 또는 인간 유두종바이러스의 E7 단백질과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 종양유전자이다.

[0184] 성장-촉진 단백질의 외부 조절은 외부적으로 조절가능한 프로모터, 예를 들면, 형질감염된 세포의 온도 또는 세포와 접촉되는 배지의 조성을 변화시킴으로써 그의 활성이 제어될 수 있는 것인 프로모터의 제어하에 성장-촉진 유전자를 놓음으로써 이루어질 수 있다. 하나의 실시태양에서, 테트라사이클린 (tet)-제어 유전자 발현 시스템이 사용될 수 있다 (문헌 ([Gossen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551, 1992]; [Hoshimaru et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1518-1523, 1996]) 참조). tet의 부재하에서 상기 벡터 내의 tet-제어 전사활성인자(transactivator) (tTA)가 tet 오퍼레이터 서열에 융합된 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 최소 프로모터인 ph_{CMV*-1}로부터의 전사를 강력하게 활성화시킨다. tTA는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)의 트랜스포존-10-유래 tet 내성 오페론의 억제인자 (tetR)와 단순 포진 바이러스의 VP16의 산성 도메인의 융합 단백질이다. tet의 낮은 비-독성 농도 (예를 들어, 0.01-1.0 ㎍/mL)에서 tTA에 의한 전사활성화는 거의 완전히 폐지된다.

[0185] 하나의 실시태양에서, 벡터는 선별가능한 마커, 예를 들어, 약물 내성을 부여하는 단백질를 코딩하는 유전자를 추가로 함유한다. 세균성 네오마이신 내성 유전자 (neo^R)는 본 발명에서 사용될 수 있는 이같은 마커이다. neo^R을 수반하는 세포는 당업계의 숙련인에게 공지된 수단, 예로서, 성장 배지에 예를 들어, 100-200 ㎍/mL의 G418을 첨가하는 것에 의해 선별될 수 있다.

[0186] 형질감염은 레트로바이러스 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 당업계의 숙련인에게 공지된 각종 수단들 중 임의의 것에 의해 이루어질 수 있다. 일반적으로, 벡터에 대한 생산자 세포주로부터 수집된 조절된 배지와 N2 보충물을 함유하는 DMEM/F12의 혼합물과의 인큐베이션에 의해 세포 배양물이 형질감염될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이 제조된 태반 세포 배양물은 1 부피의 조절된 배지 및 2 부피의 N2 보충물을 함유하는 DMEM/F12 중에서의 약 20시간 동안의 인큐베이션에 의해 시험관내에서 예를 들어 5일 후에 감염될 수 있다. 이어서, 선별가능 마커를 수반하는 형질감염된 세포가 상기 기술된 바와 같이 선별될 수 있다.

[0187] 형질감염 후, 증식을 허용하는, 예를 들어, 세포의 적어도 약 30%가 24시간의 기간 내에 2배가 되도록 하는 표면 상에 배양물을 계대한다. 바람직하게, 기판은 폴리오르니틴 (10 ㎍/mL) 및/또는 라미닌 (10 ㎍/mL)으로 코팅된 조직 배양 플라스틱으로 구성된 폴리오르니틴/라미닌 기판, 폴리리신/라미닌 기판 또는 피브로넥틴으로 처리된 표면이다. 이어서, 하나 이상의 증식-증강 인자가 보충되었거나 보충되지 않았을 수 있는 성장 배지를 배양물에 매 3-4일마다 공급한다. 배양물이 50% 미만의 융합성을 나타내면, 증식-증강 인자를 성장 배지에 첨가

할 수 있다.

[0188] 80-95% 융합성을 나타내면, 표준 기법을 사용하여, 예로서, 트립신 처리하여 조건부로 불멸화된 태반 줄기 세포주를 계대시킬 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 대략 20회의 계대까지, (예를 들면, 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 세포에 대해 G418을 첨가함으로써) 선별을 유지하는 것이 유리하다. 또한 장기 보관을 위해 세포를 액체 질소 내에 동결시킬 수 있다.

[0189] 상기 기술된 바와 같이 제조된 조건부로 불멸화된 인간 태반 줄기 세포주로부터 클론 세포주가 단리될 수 있다. 일반적으로, 상기와 같은 클론 세포주는 표준 기법을 사용하여, 예로서, 제한 희석에 의해 또는 클로닝 환을 사용하여 단리되어 확장될 수 있다. 일반적으로 클론 세포주는 상기 기술된 바와 같이 공급 및 계대될 수 있다.

[0190] 클론성일 수는 있지만 반드시 클론성일 필요는 없는, 조건부로 불멸화된 인간 태반 줄기 세포주는 일반적으로 분화를 촉진시키는 배양 조건하에 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성을 억제시킴으로써 분화되도록 유도될 수 있다. 예를 들면, 성장-촉진 단백질을 코딩하는 유전자가 외부적으로 조절가능한 프로모터의 제어하에 있는 경우, 조건, 예를 들어, 온도 또는 배지의 조성을 변형시켜 성장-촉진 유전자의 전사를 억제시킬 수 있다. 상기 논의된 테트라사이클린-제어 유전자 발현 시스템에 대해, 테트라사이클린을 첨가하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제시킴으로써 분화가 이루어질 수 있다. 일반적으로, 4-5일 동안의 1 ㎍/mL 테트라사이클린이면 분화를 개시시키는데 충분하다. 추가적인 분화를 촉진시키기 위해, 추가적인 제제가 성장 배지에 포함될 수 있다.

[0191] 5.7.4 분석법

[0192] 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 줄기 세포 증식, 확장 및/또는 분화에 대한 배양 조건, 환경 인자, 분자 (예를 들어, 생체분자, 소형 무기 분자 등) 등의 영향을 이같은 조건에 노출되지 않은 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 비교하여 측정하는 분석법에서 사용될 수 있다.

[0193] 바람직한 실시태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 분자와의 접촉시 증식, 확장 또는 분화에서의 변화에 대해 분석된다. 예를 들면, 골발생성 분화는 알칼리성 포스파타제 활성 및/또는 칼슘 무기화를 모니터함으로써 분석될 수 있다.

[0194] 하나의 실시태양에서, 예를 들면, 본원에서는 증식을 허용하는 조건하에서 태반 관류액 세포와 태반 관류액 세포의 증식을 조절하는 화합물을 접촉시키는 단계를 포함하되, 여기서, 상기 화합물이 상기 화합물과 접촉되지 않은 다수의 상기 세포와 비교하여 상기 세포의 증식에서 검출가능한 변화를 일으키는 경우, 상기 화합물이 태반 관류액 세포의 증식을 조절하는 화합물로서 확인되는 것인, 태반 관류액 세포의 증식을 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 화합물은 증식의 저해제로서 확인된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 화합물은 증식의 증강제로서 확인된다.

[0195] 또다른 실시태양에서, 본원에서는 확장을 허용하는 조건하에서 다수의 태반 세포와 다수의 태반 세포의 확장을 조절하는 화합물을 접촉시키는 단계를 포함하되, 여기서, 상기 화합물이 상기 화합물과 접촉되지 않은 다수의 상기 세포와 비교하여 상기 세포의 확장에서 검출가능한 변화를 일으키는 경우, 상기 화합물이 태반 세포의 확장을 조절하는 화합물로서 확인되는 것인, 다수의 태반 세포의 확장을 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 화합물은 확장의 저해제로서 확인된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 화합물은 확장의 증강제로서 확인된다.

[0196] 또다른 실시태양에서, 본원에서는 분화를 허용하는 조건하에서 태반 세포와 태반 세포의 분화를 조절하는 화합물을 접촉시키는 단계를 포함하되, 여기서, 상기 화합물이 상기 화합물과 접촉되지 않은 세포와 비교하여 상기 줄기 세포의 분화에서 검출가능한 변화를 일으키는 경우, 상기 화합물이 태반 세포의 증식을 조절하는 화합물로서 확인되는 것인, 태반 세포, 예를 들어, 태반 관류액 세포의 분화를 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 상기 화합물은 분화의 저해제로서 확인된다. 또다른 구체적인 실시태양에서, 상기 화합물은 분화의 증강제로서 확인된다.

[0197] 6. 실시예

[0198] 하기 실시예는 설명을 위한 목적으로 제공되는 것이며, 어느 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 특허 참고, 문헌 참고 등 어느 것이든지 간에 본원에서 인용된 모든 참고 문헌은 모든 목적을 위해 참고 문헌으로서 인용된다.

[0199] 6.1 실시예 1: 태반 관류액 세포로부터의 혈관형성 세포 생성

[0200] 상기 섹션 5.2에 기술된 바와 같이 수득된 태반 관류액에서 적혈구를 제거하고, 각종의 단핵 세포 유형이 차지하는 비율을 분석 측정하였다. 확인된 세포 유형에 대해 표 1에서 상세히 설명한다:

표 1

단일의 태반으로부터 수득된 인간 태반 관류액 중 주요 유핵 세포 군집

세포 군집	표면 마커	%
		2 (n = 8)
NK 세포	$CD3^-CD56^+$	6.45
T 세포	$CD3^+$	21.6
B 세포	$CD19^+$	6.97
내피 기원 세포	$CD34^+CD31^+$	1.69
신경 기원 세포	네스틴$^+$	2.44
조혈 기원 세포	$CD34^+$	2.21
부착성 태반 줄기 세포	$CD34^-$ $CD117^-$ $CD105^+$ $CD44^+$	0.67

[0201]

[0202] 별개의 실험에서는 인간 태반 관류액으로부터의 $CD34^+$ 태반 세포가 $CD34^+$, $CD45^-$ 세포의 하위군집을 포함하는데, 이는 소정 갯수의 유핵 세포에 대하여 제대혈에서보다 더 높은 비율로 존재한다는 것이 확립되었다. 도 1을 참조한다.

[0203] 또다른 실험에서, 인간 태반 관류액으로부터의 $CD34^+$ 세포를 유세포측정에 의해 분석하여 혈관형성-관련 마커 CD31, CXCR4 및 VEGFR을 발현하는 세포의 비율을 측정하였다. 제대혈로부터의 $CD34^+$ 세포보다 더 큰 비율의 HPP로부터의 $CD34^+$ 세포가 이들 마터를 발현시켰다. 도 2를 참조한다.

[0204] 또다른 실험에서, 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)을 사용하여 태반 $CD34^+$, $CD45^-$ 세포에서의 유전자 발현을 분석하였다. FACS ARIA (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))에 의해서 같은 인간 태반 관류액 (HPP)으로부터 $CD34^+CD45^-$ 및 $CD34^+CD45^+$ 세포 군집을 단리시키고, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosysystems) FAST 7900HT 기기 및 프라이머/프로브를 사용한 CD34, CD45, CD31 및 VEGFR 발현에 관한 qRT-PCR 분석을 위해 RNA를 제조하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, HPP $CD34^+CD45^-$ 세포에서의 CD31 및 VEGFR 발현은 두가지 모두 $CD34^+CD45^+$ 세포에서보다 더 높게 나타난다. 이러한 데이타는 HPP $CD34^+$ 세포가 혈관형성의 성질을 나타내며, 추가로, 이러한 혈관형성 활성은 $CD34^+CD45^-$ 군집에서 더욱 증강된다는 것을 제안하였다.

[0205] 내피 세포의 전구체를 확인할 수 있는 CFU-Hill 콜로니 분석법을 사용하여 HPP 세포의 혈관형성 활성을 측정하였다. 상기 섹션 5.2에 따라 수집된 인간 태반 관류액으로부터의 단핵 세포를 약 2주 동안 엔도컬트® 배지 (스템셀 테크놀로지스 인크.)에서 배양하였다. 이어서, 세포 배양물을 길즈 변형된 헤마톡실린 염료로 염색하여 CFU-Hill 콜로니를 나타내었다. 본 분석법에서는 5개의 별개의 기증자로부터 얻은 10^6개의 관류액 세포당 각각 0, 19, 7, 11 및 6개의 CFU-Hill 콜로니가 확인되었다. 도 4를 참조한다. 별개의 분석법에서는, 엔도컬트® 배지에서의 배양 7일째에 인간 태반 관류액 유래의 내피 기원 세포가 흡수하는 Dil-acLDL (디아세틸 저밀도 리포단백질)의 흡수량을 확인하였다.

[0206] 인간 태반 관류액 세포는 또한 배양물 중에서 혈관을 발생하는 것으로 나타났다. 세포를 TGF-β, FGF, 플라스미노겐, tPA 및 매트릭스 메탈로프로테아제의 존재하에서 배양할 수 있는 인비트로 안지오지네시스 어세이 키트 (In Vitro Angiogenesis Assay Kit) (케미콘(Chemicon) 카탈로그 번호 ECM625)를 사용하여 상기 섹션 5.2에 따라 수득된 인간 태반 관류액 세포를 96-웰 플레이트 중에서 웰당 약 10^6개의 세포로 EC매트릭스™ 상에서 18-24

시간 동안 배양하였다. 24시간이 경과한 후에 세포는 보이는 혈관 구조를 형성하였다. 도 5를 참조한다. 본질적으로 동일한 조건하에 있는 제대혈 세포에서는 어떤 관 형성도 관찰되지 않았다.

[0207] 6.2 실시예 2: 태반 관류액 세포를 사용한 생체내 혈관 형성

[0208] 본 실시예는 인간 태반 관류액 세포가 설치류 모델 내로 투여된 경우, 이는 골 조직 형성으로 나타낸 바와 같이, 혈관계 형성을 유발한다는 것을 입증한다.

[0209] 골 치유를 위해서는 혈관형성/혈관화가 필요하다. 예를 들면, 문헌 ([Matsumoto et al., *Amer. J. Pathology* 169: 1440-1457 (2006)] (성체 인간 말초 혈액 유래의 $CD34^+$ 하위군집은 혈관형성과 골발생성 활성, 두가지 모두를 갖는다)과 [Matsumoto et al., *Bone* 2008 pages 1-6])을 참조한다. 본 실시예는 인간 태반 관류액 (HPP)의 세포에 의한 생체내 골-형성 활성 및 혈관형성, 두가지 모두에 대하여 기술한다.

[0210] 골-형성 활성: 6주령된 흉선없는 래트의 두개관 양측에 두개 결손부 (3 ㎜ x 5 ㎜)를 만들었다. 각 동물의 좌측 결손부는 힐로스((인디애나주 바르샤바 소재의 드퓨이 오르토패딕스 인크.(DePuy Orthopaedics Inc.)) 캐리어로만 처리하고, 각 동물의 우측 결손부는 양성 대조군 (힐로스 + 골형성 단백질 2(BMP-2)), 음성 대조군 (빈 결손부)으로, 또는 HPP + 힐로스로 처리하였다. 8마리의 동물을 각 처리군으로 배정하였다. 이식 후 4주가 경과하였을 때에 래트를 희생시켰다. 조직학적 분석을 위해 두개관을 공정처리하고, 표 2의 프로토콜에 따라 조직 절편을 헤마톡실린 & 에오신으로 염색하였다 (H&E 염색).

표 2

H&E 염색 방법

[0211]

용액	시간
크실렌 치환체	5분
크실렌 치환체	5분
100% 에탄올	30초
95% 에탄올	30초
80% 에탄올	30초
70% 에탄올	30초
순수 나노수	20초
헤마톡실린	10초
수돗물	2분
청색화 시약	15 - 30초
70 % 에탄올	15 - 30초
에오신 Y	2분
80 % 에탄올	30초
95 % 에탄올	30초
95 % 에탄올	30초
100 % 에탄올	30초
100 % 에탄올	30초-1분
크실렌 치환체	5분

[0212] 결손부 내로의 골 내성장량을 0부터 4까지의 점수화 체계에 의해서 평가하였는데, 최대량인 것을 4로 하였다 (* $p < .05$ 힐로스만으로 처리된 (빈 결손부) 것과의 비교에 의함) (도 6 참조).

[0213] 혈관형성: 스캐폴드만을 단독으로 이식받은 동물군과 비교하여 HPP가 시딩된 스캐폴드를 피하로 이식받은 동물군에서의 체외이식편의 혈관생성을 입증하였다.

[0214] 물질 및 방법

[0215] 피하 스캐폴드 이식편: (연구 개시일째에) 6주령이 된 수컷 Hsd:RH-*Foxn1*^{rnu} 흉선없는 래트 내로 스캐폴드를 이식하였다. 시험군용으로는 1 mL당 5 x 10^6개의 세포로 HPP가 수동적으로 흡착되어 있는 직경이 5 ㎜인 환형의

스캐폴드 (비토스 본 그래프트 섭스티튜트(Vitoss Bone Graft Substitute), 오르토비타)를 래트에 이식하였다. 대조군에는 비토스만을 단독으로 이식시켰다. 래트를 마취시키고, 각 군 별로 등쪽, 배쪽, 또는 대퇴부 피하에 이식편을 놓았다. 수술 후 21일째 및 42일째에 선택된 래트를 CO_2로 질식시켜 안락사시켰다. 이식편을 수집하고, 10%의 정상 완충처리된 포르말린에 놓았다. 파라핀에 포매시킨 후, 면역형광 염색법을 위해서 5 ㎛ 절편을 공정처리하였다.

[0216] 면역형광 염색법: 래트 조직 중의 이식된 인간 세포를 검출하기 위해서, 1:50의 희석율로 희석된 인간-특이 CD34 내피 세포 마커 마우스 모노클로날 항체 (클론 QBEnd/10) IgG1 (노바카스트라(Novocastra) 카탈로그 번호 NCL-L-END)을 사용하여 면역조직화학법을 실시하였다 (n = 2). 1:30의 희석율로 희석된 알파 평활근 액틴 (aSMA) 마우스 모노클로날 (클론 1A4) (다코(Dako)로부터 입수, 카탈로그 번호 M0851)을 사용하여 인간 및 래트 평활근 세포, 두가지 모두를 검출하였다. 2차 항체는 하기와 같았다: CD34의 경우, 벡터 M.O.M. 면역검출용 키트 플루오레세인 카탈로그 번호 FMK-2201, 및 aSMA의 경우, 알렉사 플로르(Alexa Flour) 594-접합된 염소 항-마우스 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes) A21135). 양성 대조군은 34개의 상이한 인간 조직을 포함하는 인간 조직 마이크로어레이(판토믹스 인크.(Pantomics, Inc), 카탈로그 번호 MN0341)로 구성되었고, 음성 대조군은 맥스 어레이(Max Array) 마우스 조직 마이크로어레이 슬라이드(지메드 랩(Zymed lab), 카탈로그 번호 75-2013)였다.

[0217] 간략하면, 슬라이드를 30분 (분) 동안 56℃에서 굽고, 크실렌을 사용하여 파라핀을 제거하고 (각각 5분씩 3차례 교환), (에탄올 100%에서 70%로 통과시켜) 재수화시키고, -20℃에서 메탄올 중 0.5% 과산화수소에서 내인성 퍼옥시다제에 대하여 차단하였다. 전자레인지에서 가열한 0.01 M 시트르산염 완충액 (pH 6.0)에서 항원 복구를 실시하였다 (2회 주기, 각각 10분). 15분 동안 아비딘 및 비오틴으로 차단하였다. 마우스-온-마우스 (M.O.M.) 키트 (벡터 라보라토리즈(Vector Laboratories))를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 CD34 염색법을 실시하였다. 제2의 1차 항체 (aSMA)를 4℃에서 밤새도록 인큐베이션시키고, 상응하는 2차 항체 (AF594)를 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 각 단계 중간에서는 모두 슬라이드를 매회 5분 동안 3회에 걸쳐 PBS로 세척하였다. 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 용액을 5분간 가하여 핵을 염색시켰다. 수성 봉입 배지를 사용하여 슬라이드를 커버슬립으로 덮었다.

[0218] 영상 분석: 적절한 형광 필터 세트가 장착된 니콘 이클립스 E800(Nikon Eclipse E800)와 영상화 소프트웨어 (니스 엘리멘츠 베이직 리서치(Nis Elements Basic Research))를 사용하여 슬라이드를 관찰하였다. 혈관형성을 평가하기 위해, 5개의 다른 영역을 20X 확대시켜 각 슬라이드를 평가하고, 니스 엘리멘츠 소프트웨어에 의해서 상기 영역에서의 발현율(%)을 측정함으로써 aSMA 발현에 대하여 분석하였다.

[0219] 결과

[0220] HPP를 받은 동물에서의 내인성 혈관형성의 증강: aSMA에 대한 양성 면역염색과 내피 세포 중의 CD34 결핍에 의해서, 이식된 세포가 수혜자에 미치는 측분비 효과에 의해 혈관형성이 증가된 것을 확인하게 되었다. 조기 시점 (21일째) (n=2)에는 대조군보다 더 많은 혈관신생이 관찰되었고, 이들 새로 생긴 혈관 중에서는 특이-인간 내피 세포 마커에 관한 증거가 없었지만, 혈관에 인접해 있는 몇몇 세포는 CD34에 대해 염색되었다 (도 7). 후기 시점 (42일째)에는, 21일째 시점에 비하여는 비록 낮은 등급이기는 하지만 혈관형성이 증강된 것이 관찰되었고, HPP 군에서는 양성 CD34 세포가 관찰되지 않았다 (도 8).

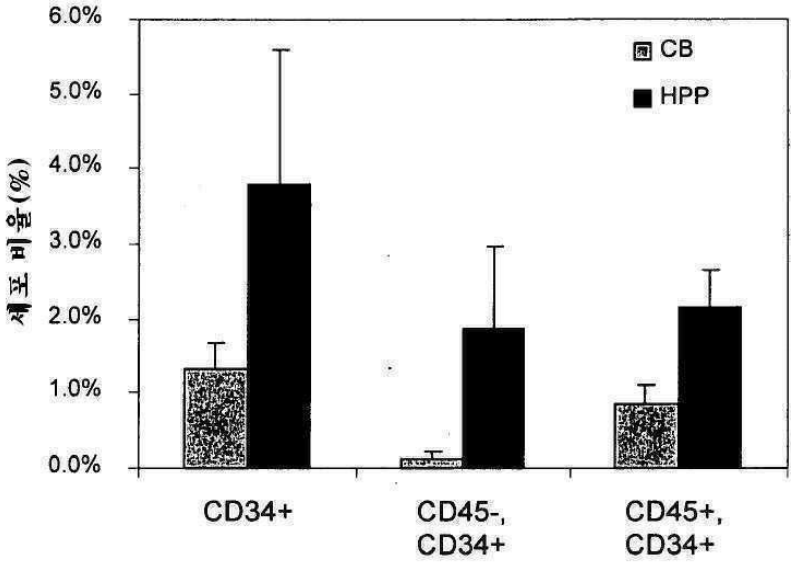
[0221] 영상 분석을 한 결과, 21일째에 대조군 (비토스만 단독)과 비교하여 HPP 군에서는 혈관형성이 통계학상 유의적으로 더 크게 나타났지만 ($p<0.01$), 42일째에는 양 군간에 어떤 통계학상의 유의적인 차이도 관찰되지 않았다 (도 9).

[0222] 본 발명은 본원에 기술된 구체적인 실시태양으로 본 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다. 실제로, 당업자에게는 본원에 기술된 것 이외에도 본 발명에 관한 다양한 변형이 상기 기술 내용으로부터 자명해질 것이다. 그러한 변형도 첨부된 특허청구범위의 범주내 포함시키고자 한다.

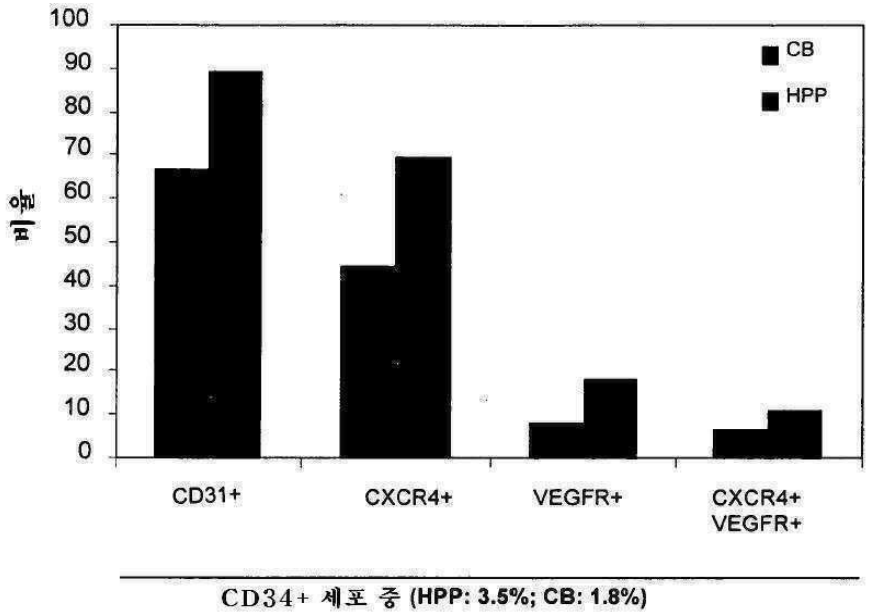
[0223] 본원에서 인용된 모든 참고 문헌은, 각 개개의 공개문헌, 특허 또는 특허 출원 그 전문이 구체적으로 그리고 개별적으로 모든 목적을 위해 참고로 인용된다고 명시된 바와 동일한 정도로 상기 참고 문헌의 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참고로 인용된다. 어느 공개 문헌을 인용하든 이는 본 출원일 이전에 개시된 것에 관한 것이며, 본 발명이 선행 발명으로 인하여 상기 공개 문헌보다 선행할 수 있는 권한이 없음을 인정하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

도면

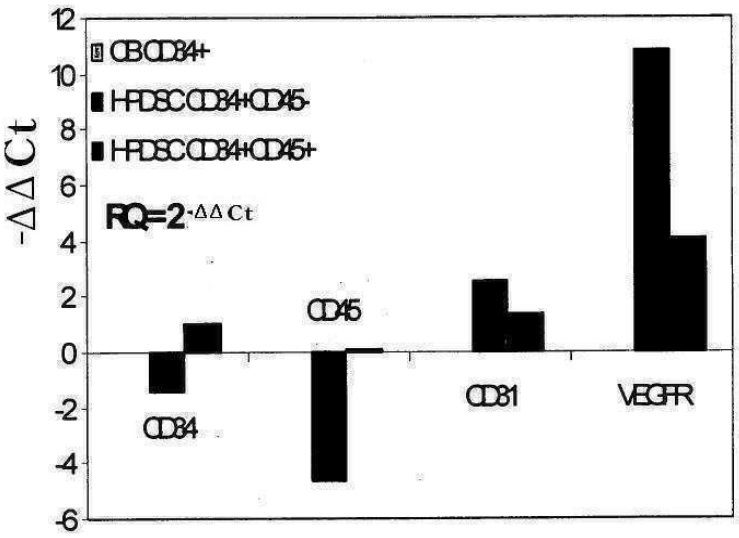
도면1


6.0%
5.0%
4.0%
3.0%
2.0%
1.0%
0.0%
세포 비율(%)
CB
HPP
CD34+
CD45-, CD34+
CD45+, CD34+

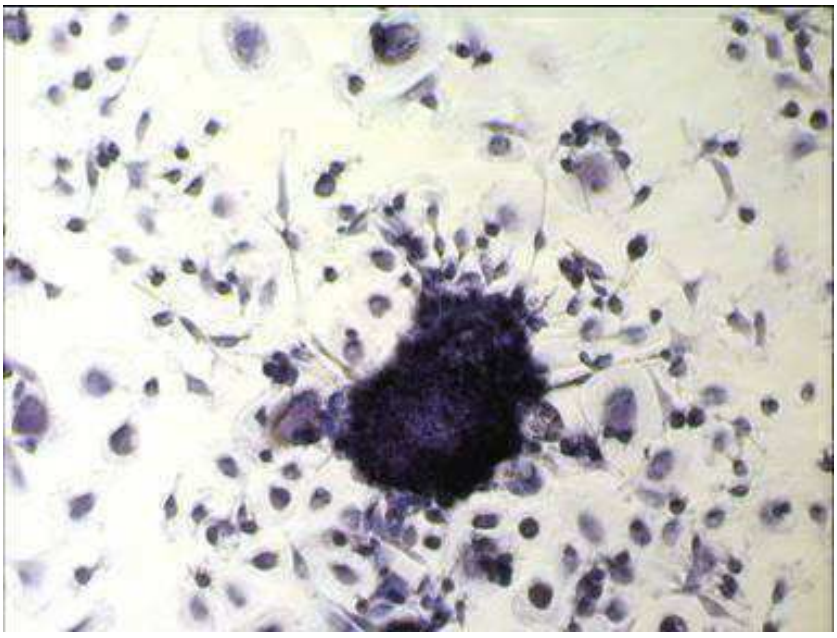
도면2


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
비율
CB
HPP
CD31+
CXCR4+
VEGFR+
CXCR4+ VEGFR+
CD34+ 세포 중 (HPP: 3.5%; CB: 1.8%)

도면3


12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-ΔΔCt
CB CD34+
HPDSC CD34+CD45-
HPDSC CD34+CD45+
RQ=2-ΔΔCt
CD34
CD45
CD31
VEGFR

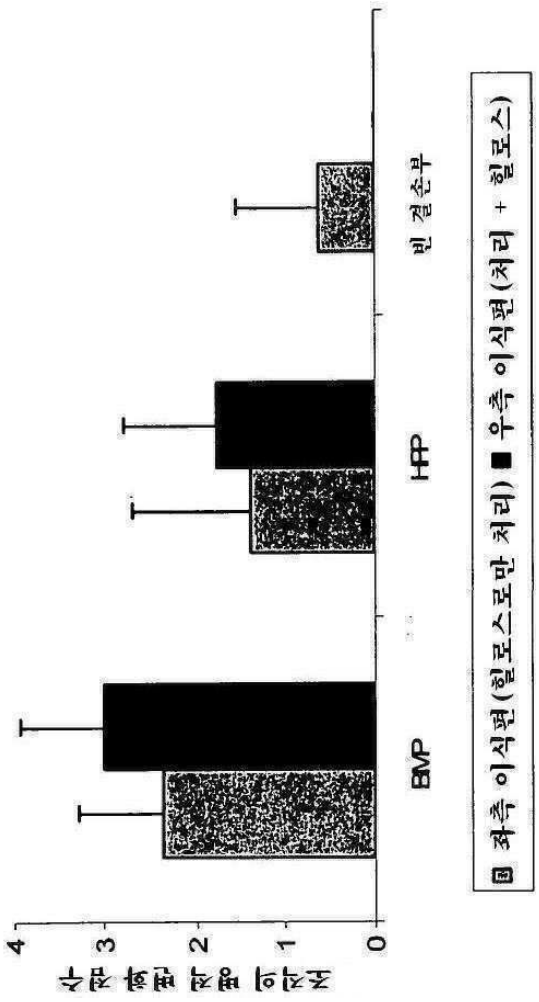
도면4



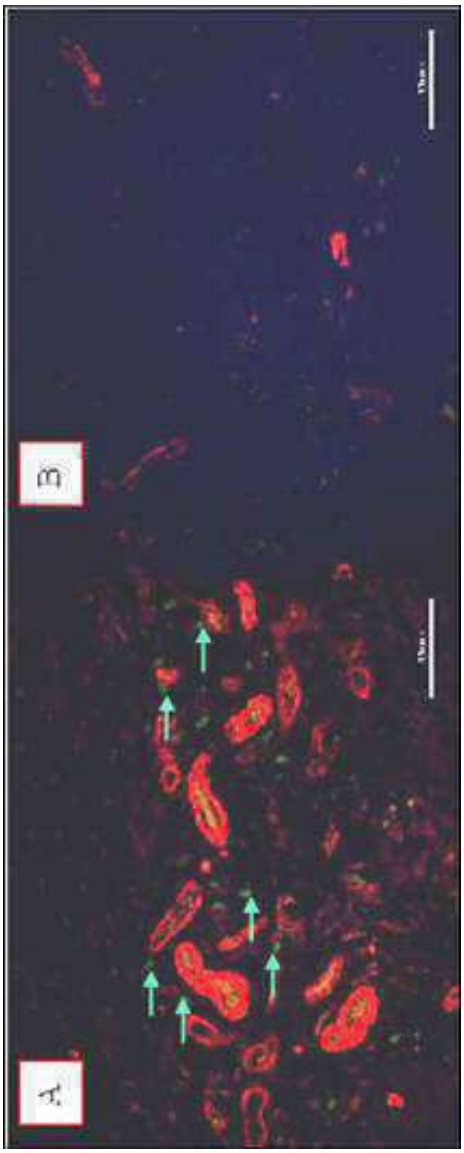
도면5



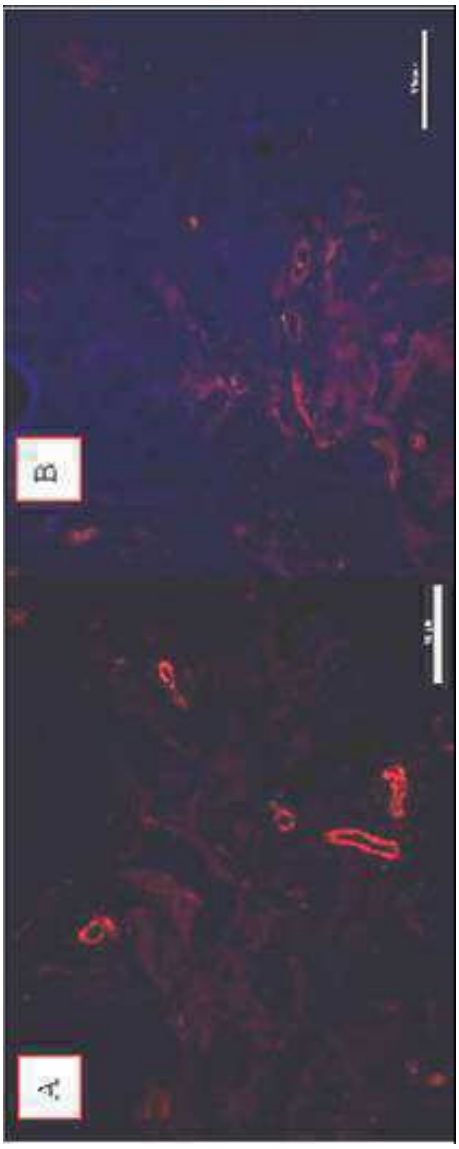
도면6



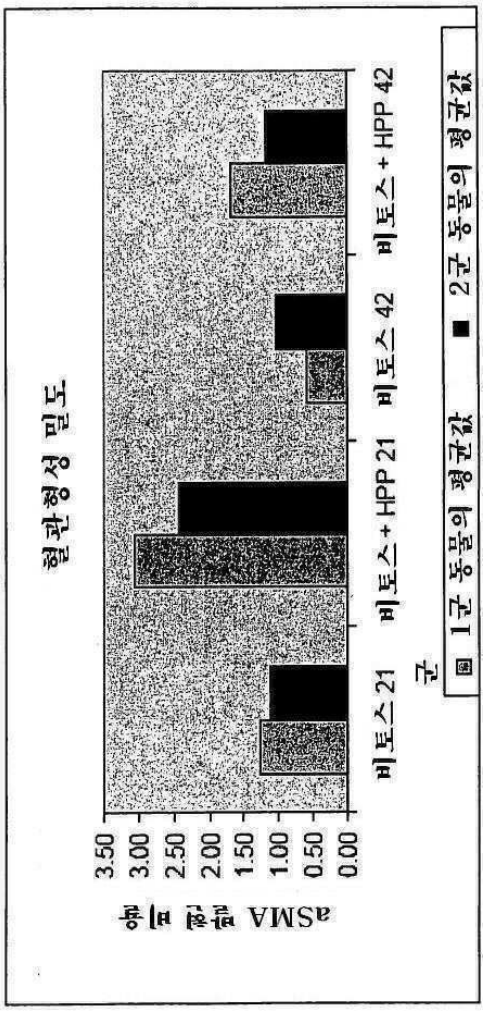
도면7



도면8



도면9


혈관형성 밀도
aSMA 발현 비율
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
비토스 21
비토스 + HPP 21
비토스 42
비토스 + HPP 42
군
1군 동물의 평균값
2군 동물의 평균값