



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0105266
(43) 공개일자 2018년09월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/073 (2010.01) A61K 35/50 (2015.01)
C12N 5/00 (2006.01) G01N 15/14 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0605 (2013.01)
A61K 35/50 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7026653(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2006년12월28일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2017-7008335
원출원일자(국제) 2006년12월28일
심사청구일자 2017년04월26일
- (85) 번역문제출일자 2018년09월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2006/049491
- (87) 국제공개번호 WO 2007/079183
국제공개일자 2007년07월12일
- (30) 우선권주장
60/754,968 2005년12월29일 미국(US)
60/846,641 2006년09월22일 미국(US)

- (71) 출원인
안트로제네시스 코퍼레이션
미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
- (72) 발명자
에브람슨, 사스카, 돈
미국 08844 뉴저지주 힐스버로우 말버로우 카먼 609에이
에딩거, 제임스, 더블유.
미국 07718 뉴저지주 벨포드 레너드빌 로드 273
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

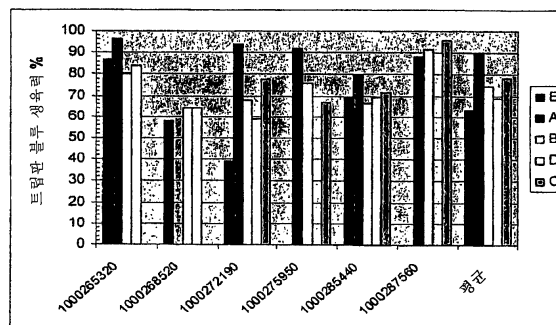
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 태반 줄기 세포 집단

(57) 요약

본 발명은 태반 줄기 세포 및 태반 줄기 세포 집단, 및 이의 배양, 증식 및 확장 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 태반 줄기 세포를 분화시키는 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 태반 줄기 세포를 분석법에서, 그리고 이식을 위해 사용하는 방법을 추가로 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 5/0018 (2013.01)

G01N 15/14 (2013.01)

G01N 33/53 (2018.05)

C12N 2501/606 (2013.01)

C12N 2533/52 (2013.01)

(72) 발명자

펠렉, 허버트

미국 07052 뉴저지주 웨스트 오렌지 레이크뷰 드라이브 19

하리리, 로버트, 제이.

미국 07924 뉴저지주 버나즈빌 멘드햄 로드 341

라바쥬, 크리스텐, 에스.

미국 07081 뉴저지주 스프링필드 뉴브룩 레인 50

페리에라, 매리언

미국 07016 뉴저지주 크랜포드 모호크 드라이브 8

왕, 자-룬

미국 08003 뉴저지주 체리 힐 래빗 런 로드 212

예, 첸

미국 07039 뉴저지주 리빙스턴 마운트헤븐 드라이브 10

명세서

청구범위

청구항 1

인간에 대한 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 미국 특허 가출원 번호 60/754,968 (2005년 12월 29일 출원); 및 미국 특허 가출원 번호 60/846,641 (2006년 9월 22일 출원)을 우선권으로 청구한다.

[0002] 1. 기술분야

[0003] 본 발명은 단리된 태반 줄기 세포, 태반 줄기 세포의 집단, 이러한 줄기 세포를 포함하는 조성물, 및 이러한 줄기 세포를 수득하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0004] 2. 배경기술

[0005] 인간 줄기 세포는 다양한 성숙형 인간 세포 계통을 생성할 수 있는 전능성(totipotent) 또는 다능성(pluripotent) 전구 세포이다. 전부는 아니어도 다수의 조직을 재증식시키고 생리적 및 해부학적 기능을 복원하는데 줄기 세포가 사용될 수 있다는 것을 나타내는 증거가 존재한다.

[0006] 다수의 상이한 유형의 포유류 줄기 세포들이 특성화되었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,486,359 (Caplan 등) (인간 중간엽 줄기 세포); 미국 특허 번호 5,004,681 (Boyse 등) (태아 및 신생아 조혈 줄기 및 기원 세포); 미국 5,192,553 (Boyse 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) 참조. 제대혈, 및 제대혈로부터 유래된 전체 유핵 세포가 절제 치료법을 받은 환자에서 조혈 기능을 부분적으로 또는 완전히 복원하기 위해 이식에서 사용되었다.

발명의 내용

[0007] 3. 발명의 개요

[0008] 본 발명은 단리된 태반 줄기 세포, 태반 줄기 세포의 집단, 이러한 줄기 세포를 포함하는 조성물, 및 이러한 줄기 세포를 수득하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 태반 조직 (예를 들어, 양막, 융모막, 태반엽 등) 내에 존재하고 이로부터 단리가능한 단리된 줄기 세포, 및 이같은 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 최초로 제공한다. 태반 줄기 세포는 줄기 세포의 1가지 이상의 특성을 나타내고 (예를 들어, 줄기 세포와 관련된 마커를 나타냄, 미분화 상태에서 배양에서 적어도 10-20 회 복제함, 3가지 배엽을 대표하는 성체 세포로 분화함 등), 조직 배양 기관 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱 예컨대 조직 배양 접시 또는 멀티웰 플레이트의 표면)에 부착될 수 있다.

[0010] 한 실시양태에서, 본 발명은 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺인 단리된 태반 줄기 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 CD200⁺ 및 HLA-G⁺이다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단으로부터의 1개 이상의 배양체(embryoid)-유사체의 형성을 용이하게 한다.

- [0011] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 태반 세포의 집단을 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상 또는 그 이상이 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 한 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 형성한다.
- [0012] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, 및 $CD200^{+}$ 인 단리된 줄기 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단으로부터의 1개 이상의 배양체-유사체의 발달을 용이하게 한다.
- [0013] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 태반 세포의 집단을 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상은 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서의 배양에서 1개 이상의 배양체-유사체를 형성한다.
- [0014] 본 발명은 $CD200^{+}$ 및 $OCT-4^{+}$ 인 단리된 줄기 세포를 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 줄기 세포는 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단으로부터의 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다.
- [0015] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 태반 세포의 집단을 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상은 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 형성한다.
- [0016] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이고, 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배양체

-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서의 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는, 단리된 줄기 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT4⁺이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT4⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다.

[0017] 본 발명은 CD73⁺, CD105⁺ 줄기 세포를 포함하고, 예를 들어, 이러한 세포가 강화되고, 이때 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 1개 이상의 배양체-유사체를 형성하는, 단리된 태반 세포의 집단을 추가로 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이 CD73⁺, CD105⁺ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다.

[0018] 본 발명은 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺인 단리된 줄기 세포를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서의 배양에서 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단으로부터의 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다.

[0019] 본 발명은 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 태반 세포의 집단을 추가로 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우 배양체-유사체를 형성한다.

[0020] 본 발명은 OCT-4⁺이고, 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단에서의 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는, 단리된 줄기 세포를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다.

[0021] 본 발명은 OCT-4⁺ 태반 줄기 세포를 포함하고, 예를 들어, 이러한 세포가 강화되고, 이때 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 형성하는, 단리된 세포의 집단을 또한 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이 OCT4⁺ 태반 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 더욱 특정한 실

시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다.

[0022] 본 발명은 제대혈이 배수되고 나머지 혈액을 제거하도록 관류된 포유류 태반을 관류시키는 단계; 상기 태반을 관류 용액으로 관류시키는 단계; 상기 관류 용액을 수집하고, 이때 관류 후의 상기 관류 용액이 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 포함하는 단계; 및 상기 세포 집단으로부터 다수의 상기 태반 줄기 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 따라 생산된, 본원에 기술된 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 관류 용액은 배꼽 정맥 및 배꼽 동맥 모두에 통과되고, 태반으로부터 삼출된 후 수집된다. 또다른 특정 실시양태에서, 관류 용액이 배꼽 정맥에 통과되고 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 또는 배꼽 동맥에 통과되고 배꼽 정맥으로부터 수집된다.

[0023] 본 발명은 태반 조직을 조직-파괴 효소로 소화시켜 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 수득하는 단계, 및 다수의 태반 줄기 세포를 나머지 상기 태반 세포로부터 분리하는 단계를 포함하는 방법에 따라 생산된, 본원에 기술된 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 태반 조직은 전체 태반, 양막, 용모막, 양막 및 용모막의 조합물, 또는 임의의 상기의 것들의 조합물이다. 또다른 특정 실시양태에서, 조직-파괴 효소는 트립신 또는 콜라게나제이다.

[0024] 더욱 특정한 실시양태들에서, 본 발명은 줄기 세포가 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PJP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A로 구성된 군으로부터 선택된 1가지 이상의 유전자를 태반 줄기 세포에 진행된 계대의 수와 동등한 다수의 계대 배양이 진행된 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하는, 상기의 분리된 줄기 세포들 중 임의의 것을 제공한다. 이러한 유전자들에 상응하는 서열은 Affymetrix GENECHIP®에서 발견된다. 이러한 유전자들은 2006년 12월 현재 GenBank 접속 번호 NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 또는 BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), 및 BC005001 (ZC3H12A)에서 또한 발견할 수 있다.

[0025] 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A를 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다.

[0026] 더욱 특정한 실시양태에서, 본 발명은 줄기 세포가 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A로 구성된 군으로부터 선택된 1가지 이상의 유전자를 태반 줄기 세포에 진행된 계대의 수와 동등한 다수의 계대 배양이 진행되었고, 분리된 줄기 세포의 집단과 동등한 다수의 세포가 있는 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 집단보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하는, 상기의 분리된 줄기 세포의 집단들 중 임의의 것을 또한 제공한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 분리된 줄기 세포의 집단은 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A를 분리된 골수

-유래 중간엽 줄기 세포의 상기 집단보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다.

[0027] 세포 집단을 선별하는 방법의 더욱 특정한 실시양태에서, 본 발명은 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A로 구성된 군으로부터 선택된 1가지 이상의 유전자를 태반 줄기 세포에 진행된 계대의 수와 동등한 다수의 계대 배양이 진행된 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하는 세포를 선별하는 단계를 포함하는, 상기 언급된 세포 집단들 중 하나를 선별하는 방법을 또한 제공한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 선별은 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A를 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 집단보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하는 세포를 선별하는 것을 포함한다.

[0028] 본 발명은 태반으로부터 단리된 1가지 이상의 본 발명의 줄기 세포를 포함하는 조성물을 또한 제공한다. 따라서, 본 발명은 CD200⁺ 및 HLA-G⁺인 줄기 세포를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻ CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 및 HLA-G⁺이다.

[0029] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD73⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺인 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 HLA-G⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ 및 HLA-G⁺이다.

[0030] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD200⁺ 및 OCT-4⁺인 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 HLA-G⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺, 및 HLA-G⁺이다.

[0031] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD73⁺ 및 CD105⁺인 줄기 세포를 포함하고, 이때 상기 줄기 세포가 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 상기 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단에서 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다.

[0032] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺인 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 OCT-4⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다.

[0033] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 OCT-4⁺인 줄기 세포를 포함하고, 이때 상기 줄기 세포가 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 상기 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단에서 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또다른 특정 실시

양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다.

[0034] 상기 조성물들의 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A로 구성된 군으로부터 선택된 1가지 이상의 유전자를 상기 태반 줄기 세포에 진행된 계대의 수와 동등한 다수의 계대 배양이 진행된 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다. 상기 조성물들의 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A를 단리된 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 집단보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하고, 이때 상기 줄기 세포 집단 및 상기 골수-유래 중간엽 세포 집단은 세포의 수가 동등하다.

[0035] 또다른 특정 실시양태에서, 임의의 상기 조성물은 매트릭스를 포함한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 매트릭스는 3차원 스캐폴드(scaffold)이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 매트릭스는 콜라겐, 젤라틴, 라미닌, 피브로넥틴, 펩틴, 오르니틴, 또는 비트로넥틴을 포함한다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 매트릭스는 양막 또는 양막-유래 생체재료이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 매트릭스는 세포의 막 단백질을 포함한다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 매트릭스는 합성 화합물을 포함한다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 매트릭스는 생활성(bioactive) 화합물을 포함한다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 생활성 화합물은 성장 인자, 사이토카인, 항체, 또는 5,000 달톤 미만의 유기 분자이다.

[0036] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 줄기 세포 또는 임의의 상기 줄기 세포 집단으로 조건화(conditioning)된 배지를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 임의의 이같은 조성물은 태반으로부터 유래되지 않은 줄기 세포를 포함한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 골수-유래 줄기 세포이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 기원 세포이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 체세포 줄기 세포이다. 더욱 더 특정한 실시양태에서, 상기 체세포 줄기 세포는 신경 줄기 세포, 간 줄기 세포, 췌장 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 심장 줄기 세포, 또는 근육 줄기 세포이다.

[0037] 본 발명은 포유류 태반으로부터 유래된 줄기 세포의 집단을 생산하는 방법을 또한 제공한다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 본 발명은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD200 및 HLA-G를 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 단리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD73, CD105, 및 CD200을 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 단리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD200 및 OCT-4를 발현하는 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 단리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD73 및 CD105를 발현하며, (c) 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 태반 세포의 집단과 함께 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 단리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 (a) 기관에 부착하고, (b) OCT-4를 발현하며, (c) 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 태반 세포의 집단과 함께 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 단리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 또한 제공한다. 임의의 상기 방법들의 특정 실시양태에서, 상기 기관은 피브로넥틴을 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 ABC-p를 발현하는 세포를 선별하는 것을 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 중간엽 줄기 세포에 특이적인 1가지 이상의 특성을 나타내는 세포를 선별하는 것을 포함한다. 더욱 특정한 실시양태에서, 중간엽

줄기 세포에 특이적인 상기 특성은 CD29의 발현, CD44의 발현, CD90의 발현, 또는 상기의 것들의 조합물의 발현이다. 방법들의 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 항체를 사용하여 달성된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 유세포측정을 사용하여 달성된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 자기 비드를 사용하여 달성된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 형광-활성화 세포 분류에 의해 달성된다. 상기 방법들의 또다른 특정 실시양태에서, 상기 세포 집단이 확장된다.

[0038] 본 발명은 줄기 세포를 성장-촉진 단백질을 코딩하는 DNA 서열로 형질전환시키는 단계; 및 상기 줄기 세포를 상기 성장-촉진 단백질의 생산을 촉진하는 조건에 노출시키는 단계를 포함하는, 줄기 세포주의 생산 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 성장-촉진 단백질은 v-myc, N-myc, c-myc, p53, SV40 대형 T 항원, 폴리오마 대형 T 항원, E1a 아데노바이러스 또는 인간 유두종바이러스 E7 단백질이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 DNA 서열은 조절성이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 DNA 서열은 테트라사이클린에 의해 조절가능하다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 성장-촉진 단백질은 조절성 활성을 갖는다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 성장-촉진 단백질은 온도-민감성 돌연변이체이다.

[0039] 본 발명은 냉동보존된 줄기 세포 집단을 추가로 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 냉동보존된 CD200⁺, HLA-G⁺ 줄기 세포의 집단을 제공하고, 이때 상기 세포 집단은 컨테이너 내에 함유된다. 본 발명은 냉동보존된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 줄기 세포의 집단을 또한 제공하고, 이때 상기 세포 집단은 컨테이너 내에 함유된다. 본 발명은 냉동보존된 CD200⁺, OCT-4⁺ 줄기 세포의 집단을 또한 제공하고, 이때 상기 세포 집단은 컨테이너 내에 함유된다. 본 발명은 냉동보존된 CD73⁺, CD105⁺ 줄기 세포의 집단을 또한 제공하고, 이때 상기 세포 집단은 컨테이너 내에 함유되고, 상기 줄기 세포는 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 태반 세포의 집단과 함께 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다. 본 발명은 냉동보존된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 줄기 세포의 집단을 또한 제공하고, 이때 상기 세포 집단은 컨테이너 내에 함유된다. 본 발명은 냉동보존된 OCT-4⁺ 줄기 세포의 집단을 또한 제공하고, 이때 상기 세포 집단은 컨테이너 내에 함유되고, 상기 줄기 세포는 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 태반 세포의 집단과 함께 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다. 임의의 상기 냉동보존된 집단들의 특정 실시양태에서, 상기 컨테이너는 백(bag)이다. 다양한 특정 실시양태에서, 상기 집단은 약, 적어도 또는 최대 1×10^6 개의 상기 줄기 세포, 5×10^6 개의 상기 줄기 세포, 1×10^7 개의 상기 줄기 세포, 5×10^7 개의 상기 줄기 세포, 1×10^8 개의 상기 줄기 세포, 5×10^8 개의 상기 줄기 세포, 1×10^9 개의 상기 줄기 세포, 5×10^9 개의 상기 줄기 세포, 또는 1×10^{10} 개의 상기 줄기 세포를 포함한다. 임의의 상기 냉동보존된 집단들의 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 약, 적어도 또는 최대 5회, 최대 10회, 최대 15회, 또는 최대 20회 계대되었다. 임의의 상기 냉동보존된 집단들의 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 상기 컨테이너 내에서 확장되었다.

[0040] 3.1 정의

[0041] 본원에서 사용된 용어 "SH2"는 마커 CD105 상의 에피토프(epitope)에 결합하는 항체를 지칭한다. 따라서, SH2⁺로 지칭되는 세포는 CD105⁺이다.

[0042] 본원에서 사용된 용어 "SH3" 및 SH4"는 마커 CD73 상의 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 따라서, SH3⁺ 및/또는 SH4⁺로 지칭되는 세포는 CD73⁺이다.

[0043] 본원에서 사용된 용어 "단리된 줄기 세포"는 줄기 세포가 유래되는 조직, 예를 들어, 태반의 다른 비-줄기 세포로부터 실질적으로 분리된 줄기 세포를 의미한다. 줄기 세포는 줄기 세포와 천연적으로 회합된 비-줄기 세포, 또는 상이한 마커 프로파일을 나타내는 줄기 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가, 예를 들어, 줄기 세포의 수집 및/또는 배양 동안, 줄기 세포로부터 제거된 경우에 "단리"된다.

[0044] 본원에서 사용된 용어 "단리된 세포의 집단"은 세포의 집단이 유래되는 조직, 예를 들어, 태반의 다른 세포로부터 실질적으로 분리된 세포의 집단을 의미한다. 줄기 세포는 세포의 집단 또는 세포의 집단이 유래된 세포와 천연적으로 회합된 세포, 즉 상이한 마커 프로파일을 디스플레이하는 줄기 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가, 예를 들어, 줄기 세포의 수집 및/또는 배양 동안, 줄기 세포로부터 제

거된 경우에 "단리"된다.

[0045] 본원에서 사용된 용어 "태반 줄기 세포"는 형태학, 세포 표면 마커, 또는 1차 배양 후의 계대 횟수와 상관 없이 포유류 태반으로부터 유래된 줄기 세포 또는 기원 세포를 지칭한다. 그러나, 본원에서 사용된 용어 "태반 줄기 세포"는 영양막(trophoblast)을 지칭하지 않는다. 세포가 줄기 세포의 1가지 이상의 속성, 예를 들어, 1가지 이상의 유형의 줄기 세포와 관련된 마커 또는 유전자 발현 프로파일; 배양에서 적어도 1-40회 복제하는 능력, 모든 3가지 배엽의 세포로 분화하는 능력; 성체 (즉, 분화된) 세포 특성의 결여 등을 보유하는 경우 세포는 "줄기 세포"로 간주된다. 용어 "태반 줄기 세포" 및 "태반-유래 줄기 세포"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0046] 본원에서 사용될 때, 특정 마커가 배경을 초과하여 검출가능한 경우 줄기 세포는 이러한 마커에 대해 "양성"이다. 예를 들어, 태반 줄기 세포는, 예를 들어, CD73에 대해 양성인데, 이는 CD73이 태반 줄기 세포 상에서 배경 (예를 들어, 이소타입(isotype) 대조군과 비교하여)보다 검출가능하게 더 큰 양으로 검출가능하기 때문이다. 마커가 세포를 1가지 이상의 다른 세포 유형으로부터 구별하는데 사용될 수 있거나 또는 세포에 의해 발현되거나 존재할 때 세포를 선별 또는 단리하는데 사용될 수 있는 경우 세포는 이러한 마커에 대해 또한 양성이다. 예를 들어, 항체-매개 검출의 상황에서, 특정 세포 표면 마커가 존재한다는 것의 지시로서의 "양성"은 마커에 특이적인 항체, 예를 들어, 형광-표지 항체를 사용하여 마커가 검출가능하다는 것을 의미한다; 또한 "양성"은 세포가, 예를 들어, 세포측정기에서, 배경을 초과하여 검출가능한 신호를 생산하는 양으로 이러한 마커를 보유한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 세포가 CD200에 특이적인 항체로 검출가능하게 표지되고, 항체로부터의 신호가 대조군 (예를 들어, 배경)보다 검출가능하게 높은 경우 항체는 "CD200⁺"이다. 역으로, 동일한 상황에서의 "음성"은 배경과 비교하여 이러한 마커에 특이적인 항체를 사용하여 세포 표면 마커가 검출가능하지 않다는 것을 의미한다. 예를 들어, 세포가 CD34에 특이적인 항체로 검출가능하게 표지되지 않는 경우 세포는 "CD34⁻"이다. 본원에서 달리 지시되지 않는 한, 분화 클러스터 ("CD") 마커는 항체를 사용하여 검출된다. OCT-4가 RT-PCR을 사용하여 검출가능한 경우 OCT-4가 존재하는 것으로 결정되고, 세포가 "OCT-4⁺"이다.

도면의 간단한 설명

[0047] 4. 도면의 간단한 설명

도 1: 관류 (A), 양막 (B), 융모막 (C), 양막-융모막관 (D) 또는 제대 (E)로부터의 태반 줄기 세포의 생육력. X-축의 숫자는 줄기 세포가 수득된 태반을 가리킨다.

도 2: FACSCalibur에 의해 결정된 관류 (A), 양막 (B), 융모막 (C), 양막-융모막관 (D) 또는 제대 (E)로부터의 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포 백분율. X-축의 숫자는 줄기 세포가 수득된 태반을 가리킨다.

도 3: FACS Aria에 의해 결정된 관류 (A), 양막 (B), 융모막 (C), 양막-융모막관 (D) 또는 제대 (E)로부터의 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포 백분율. X-축의 숫자는 줄기 세포가 수득된 태반을 가리킨다.

도 4: 태반 관류액으로부터 유래된 줄기 세포에서의 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 발현.

도 5: 양막으로부터 유래된 줄기 세포에서의 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 발현.

도 6: 융모막으로부터 유래된 줄기 세포에서의 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 발현.

도 7: 양막-융모막관으로부터 유래된 줄기 세포에서의 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 발현.

도 8: 제대로부터 유래된 줄기 세포에서의 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 발현.

도 9: 관류 (A), 양막 (B), 융모막 (C), 양막-융모막관 (D) 또는 제대 (E)로부터 유래된 줄기 세포에서의 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200 발현의 평균 발현.

도 10: 본 연구에서 사용된 양막/융모막 (AC), 제대 (UC), 골수-유래 줄기 세포 (BM-MSC) 및 인간 피부 섬유모 세포 (NHDF) 세포주에 대한 배양 시간 과정. 동일한 과정 및 계대 밀도를 사용하여 모든 배양물이 성장 및 증

식되었다. 원은 어떤 배양물이 RNA 단리에 사용되었는지를 가리킨다. 노화 직전에 후기 배양물이 수확되었다. 유전자 발현에 대한 트립신처리의 효과를 비교하기 위해 2개의 UC 배양물이 38회의 배가에서 수확되었다 (UC-38). 모든 다른 배양물들은 RNA 단리 전에 이들의 배양 플라스크에서 직접 용해되었다.

도 11 : 양막/융모막 (AC), 제대 (UC), 골수-유래 줄기 세포 (BM-MSC) 및 인간 피부 섬유모세포 (DF) 세포에서의 8215개의 유전자의 상대적인 발현 수준의 선도. X-축의 각각의 세포주 명칭과 관련된 숫자는 유전자 발현 수준의 평가 전에 세포주가 배양된 일수를 가리킨다. 차트는 GeneSpring 소프트웨어에 의해 분석된 RNA 발현 데이터로부터 생성되었다. AC-03이 선별된 조건으로 사용되었다.

도 12: 양막/융모막 (AC), 제대 (UC), 골수-유래 줄기 세포 (BM-MSC) 및 인간 피부 섬유모세포 (DF) 세포에 대한 AC-03에서 6배 이상 과발현된 유전자를 나타내는 모든 유전자 목록의 부분 집합. X-축의 각각의 세포주 명칭과 관련된 숫자는 유전자 발현 수준의 평가 전에 세포주가 배양된 일수를 가리킨다. 차트는 GeneSpring 소프트웨어에 의해 분석된 RNA 발현 데이터로부터 생성되었다. AC-03이 선별된 조건으로 사용되었다.

도 13: 양막/융모막 (AC), 제대 (UC), 골수-유래 줄기 세포 (BM-MSC) 및 인간 피부 섬유모세포 (DF) 세포에 대한 배수(fold) 변화 필터링에 의해 발견된 태반 줄기 세포-특이적 또는 제대 줄기 세포-특이적 유전자. X-축의 각각의 세포주 명칭과 관련된 숫자는 유전자 발현 수준의 평가 전에 세포주가 배양된 일수를 가리킨다. 차트는 GeneSpring 소프트웨어에 의해 분석된 RNA 발현 데이터로부터 생성되었다. AC-03이 선별된 조건으로 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

5. 발명의 상세한 설명

5.1 태반 줄기 세포 및 태반 줄기 세포 집단

태반 줄기 세포는 조직 배양 기관에 부착하고 비-태반 세포 유형으로 분화하는 능력이 있는, 태반 또는 이의 일 부분으로부터 수득가능한 줄기 세포이다. 태반 줄기 세포는 기원이 태아 또는 모체일 수 있다 (즉, 각각 태아 또는 어머니의 유전자형을 가질 수 있다). 바람직하게는, 본 발명의 태반 줄기 세포 및 태반 줄기 세포 집단은 기원이 태아이다. 태반 줄기 세포의 집단, 또는 태반 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단은 기원이 단독으로 태아 또는 모체인 태반 줄기 세포를 포함할 수 있거나, 또는 태아 및 모체 기원 양쪽 모두의 태반 줄기 세포의 혼합 집단을 포함할 수 있다. 태반 줄기 세포, 및 태반 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단은 하기 논의된 형태학적, 마커 및 배양 특성에 의해 확인 및 선별될 수 있다.

5.1.1 물리적 및 형태학적 특성

본 발명의 태반 줄기 세포는, 1차 배양 또는 세포 배양에서 배양될 때, 조직 배양 기관, 예를 들어, 조직 배양 컨테이너 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱)에 부착한다. 배양물 내의 태반 줄기 세포는 일반적으로 섬유모세포양의 성장 외관을 나타내고, 다수의 세포질 돌기가 중앙 세포 몸체로부터 확장된다. 그러나, 태반 줄기 세포가 섬유모세포보다 더 많은 수의 이같은 돌기를 나타내기 때문에 태반 줄기 세포는 동일한 조건 하에 배양된 섬유모세포로부터 형태학적으로 구별가능하다. 형태학적으로, 태반 줄기 세포는 배양에서 더욱 둥글거나 자갈형인 형태를 일반적으로 나타내는 조혈 줄기 세포로부터 또한 구별가능하다.

5.1.2 세포 표면, 분자성 및 유전학적 마커

본 발명의 태반 줄기 세포, 및 태반 줄기 세포의 집단은 줄기 세포 또는 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단을 확인 및/또는 단리하는데 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현한다. 본 발명의 태반 줄기 세포, 및 줄기 세포 집단 (즉, 2가지 이상의 태반 줄기 세포)은 태반 또는 이의 임의의 일부분 (예를 들어, 양막, 융모막, 태반엽 등)으로부터 직접 수득된 줄기 세포 및 줄기 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 태반 줄기 세포 집단은 배양물 내의 태반 줄기 세포의 집단 (즉, 2가지 이상의 태반 줄기 세포), 및 컨테이너, 예를 들어, 백 내의 집단을 또한 포함한다. 그러나, 태반 줄기 세포는 영양막이 아니다.

본 발명의 태반 줄기 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, CD200, HLA-G, 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38, 또는 CD45를 발현하지 않는다. 태반 줄기 세포는 HLA-ABC (MHC-1) 및 HLA-DR을 또한 발현할 수 있다. 이러한 마커들은 태반 줄기 세포를 확인하고, 태반 줄기 세포를 다른 줄기 세포 유형으로부터 구별하는데 사용될 수 있다. 태반 줄기 세포는 CD73 및 CD105를 발현할 수 있기 때문에, 중간엽 줄기 세포-유사 특성이 있을 수 있다. 그러나, 태반 줄기 세포는 태아-특이적 마커인 CD200 및 HLA-G를 발현할 수 있기 때문에, CD200 또는

HLA-G를 발현하지 않는 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수 있다. 동일한 방식으로, CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현 결여로 태반 줄기 세포가 조혈 줄기 세포가 아닌 것으로 확인된다.

[0056] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 $CD200^{+}$ 또는 $HLA-G^{+}$ 인 단리된 줄기 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 태반 줄기 세포이다. 특정 실시양태에서, 이러한 줄기 세포는 $CD200^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 $CD200^{+}$ 또는 $HLA-G^{+}$ 줄기 세포는 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 이러한 마커들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0057] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD200^{+}$ 또는 $HLA-G^{+}$ 태반 세포를 선별함으로써 상기 세포가 태반 줄기 세포인 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포를 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 $CD200^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 양쪽 모두인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다.

[0058] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 집단은 태반 세포의 집단이다. 다양한 실시양태들에서, 상기 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상 또는 약 60% 이상이 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포의 약 70% 이상이 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포이다. 더욱 바람직하게는, 상기 세포의 적어도 약 90%, 95%, 또는 99%가 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포이다. 단리된 집단의 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 실시양태에서, 상기 단리된 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 생산한다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 마커들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0059] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상이 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 줄기 세포인 태반 세포의 집단을 선별하는 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포 집단을 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 형성하는 태반 줄기 세포 집단을 선별하는 단계를 또한 포함한다.

[0060] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$ 인 단리된 줄기 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 단리된 줄기 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, 및 $HLA-G^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$ 줄기 세포는 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 이러한 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 이러한 마커들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0061] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$ 태반 세포를 선별함으로써 상기 세포가 태반 줄기 세포인 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포를 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $HLA-G^+$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, 및 $HLA-G^+$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 조건 하에 배양되는 경우 이러한 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$ 줄기 세포를 선별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0062] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 세포 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 태반 줄기 세포이다. 다양한 실시양태들에서, 상기 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상이 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 줄기 세포이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포 집단 내의 상기 세포의 약 70% 이상이 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 줄기 세포이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포 집단 내의 상기 세포의 적어도 약 90%, 95% 또는 99%가 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, 및 $HLA-G^+$ 이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 생산한다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0063] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상이 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 줄기 세포인 태반 세포의 집단을 선별하는 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포 집단을 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $HLA-G^+$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, 및 $HLA-G^+$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 집단이 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 생산하는 태반 세포의 집단을 선별하는 단계를 추가적으로 포함한다.

- [0064] 본 발명은 $CD200^{+}$ 및 $OCT-4^{+}$ 인 단리된 줄기 세포를 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 태반 줄기 세포이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 이러한 집단에 의한 1개 이상의 배양체-유사체의 생산을 용이하게 한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 이러한 마커들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.
- [0065] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD200^{+}$ 및 $OCT-4^{+}$ 태반 세포를 선별함으로써 상기 세포가 태반 줄기 세포인 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포를 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $HLA-G^{+}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 이러한 집단에 의한 1개 이상의 배양체-유사체의 생산을 용이하게 하는 태반 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다.
- [0066] 본 발명은 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 단리된 세포 집단을 또한 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상이 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포의 약 70% 이상이 상기 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포의 적어도 약 90%, 95%, 또는 99%가 상기 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포이다. 단리된 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 집단은 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 생산한다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.
- [0067] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상이 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포인 태반 세포의 집단을 선별하는 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포 집단을 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $HLA-G^{+}$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 인 줄기 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다.
- [0068] 본 발명은 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 인 단리된 줄기 세포를 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 태반 줄기 세포이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $OCT-4^{+}$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^{+}$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기

세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT-4^+$ 및 $CD200^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 상기 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 이러한 집단에서 배양체-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리된다.

[0069] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$ 태반 세포를 선별함으로써 상기 세포가 태반 줄기 세포인 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포를 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $OCT-4^+$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD200^+$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT-4^+$ 및 $CD200^+$ 인 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 선별은 상기 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 또한 용이하게 하는 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다.

[0070] 본 발명은 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어, 이러한 세포가 강화된, 분리된 세포 집단을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 태반 줄기 세포이다. 다양한 실시양태들에서, 상기 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상이 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$ 줄기 세포이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포의 약 70% 이상이 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$ 이다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포의 적어도 약 90%, 95% 또는 99%가 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $OCT-4^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT-4^+$ 및 $CD200^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리된다.

[0071] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 대다수의 세포가 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$ 인 태반 세포의 집단을 선별하는 단계를 포함하는, 다수의 태반 세포로부터 태반 줄기 세포 집단을 선별하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 대다수의 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및/또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 대다수의 세포는 또한 $CD200^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 대다수의 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT-4^+$ 및 $CD200^+$ 이다.

[0072] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이고, 줄기 세포를 포함하는 분리된 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서의 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는, 분리된 줄기 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $OCT4^+$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $OCT4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리된다.

[0073] 본 발명은 $CD73^+$, $CD105^+$ 줄기 세포를 포함하고, 예를 들어, 이러한 세포가 강화되고, 이때 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 1개 이상의 배양체-유사체를 형성하는, 분리된 태반 세포의 집단을 추가로 제

공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상이 $CD73^+$, $CD105^+$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $OCT-4^+$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $OCT-4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0074] 본 발명은 $OCT-4^+$ 이고, 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단에서의 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는, 단리된 줄기 세포를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0075] 본 발명은 $OCT-4^+$ 태반 줄기 세포를 포함하고, 예를 들어, 이러한 세포가 강화되고, 이때 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 1개 이상의 배양체-유사체를 형성하는, 단리된 세포의 집단을 또한 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 상기 단리된 태반 세포의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이 $OCT4^+$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, 또는 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$ 이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, 및 $CD45^-$ 이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 집단은 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상, 또는 20회 이상 확장되었고, 예를 들어, 계대되었다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0076] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$ 인 단리된 태반 줄기 세포를 또한 제공한다. 본 발명은 태반 줄기 세포의 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상이 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$ 인, 태반 줄기 세포의 단리된 집단을 추가로 제공한다. 상기 실시양태들의 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 추가적으로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$ 이다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 단리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-모체이다.

[0077] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 $HLA-A,B,C^-$, $CD45^-$, $CD133^-$ 및 $CD34^-$ 인 단리된 태반 줄기 세포를 제공한다. 본 발명은 태반 줄기 세포의 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상이 $HLA-A,B,C^-$, $CD45^-$, $CD133^-$ 및 $CD34^-$ 인 태반 줄기 세포의 단리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 단리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-

모체이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻인 태반 줄기 세포를 태반 관류액으로부터 분리하는 단계를 포함하는, HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻인 태반 줄기 세포의 수득 방법을 제공한다.

[0078] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻인 분리된 태반 줄기 세포를 제공한다. 본 발명은 태반 줄기 세포의 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상이 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻인, 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 분리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 분리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리된다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻인 태반 줄기 세포를 태반 관류액으로부터 분리하는 단계를 포함하는, CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻인 태반 줄기 세포의 수득 방법을 제공한다.

[0079] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻인 분리된 태반 줄기 세포를 제공한다. 본 발명은 태반 줄기 세포의 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상이 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻인, 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 분리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 분리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리된다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻인 태반 줄기 세포를 태반 관류액으로부터 분리하는 단계를 포함하는, CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻인 태반 줄기 세포의 수득 방법을 제공한다.

[0080] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻인 분리된 태반 줄기 세포를 제공한다. 본 발명은 태반 줄기 세포의 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상이 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻인 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 분리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 분리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리된다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻인 태반 줄기 세포를 태반 관류액으로부터 분리하는 단계를 포함하는, CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻인 태반 줄기 세포의 수득 방법을 제공한다.

[0081] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고/이거나, CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대해 양성이고/이거나, CD117에 대해 음성인, 분리된 태반 줄기 세포를 제공한다. 본 발명은 줄기 세포가 HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고, 집단 내의 줄기 세포의 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 약 99%가 CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대해 양성이고/이거나 CD117에 대해 음성인, 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 분리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 분리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단은 이러한 특성들을 디스플레이하지 않는 태반 줄기 세포로부터 분리

된다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고, CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대해 양성이고/이거나, CD117에 대해 음성인 태반 줄기 세포를 태반 관류액으로부터 분리하는 단계를 포함하는, HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고, CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대해 양성이고/이거나, CD117에 대해 음성인 태반 줄기 세포의 수득 방법을 제공한다.

[0082] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 항체 결합에 의해 결정된 바와 같이 CD200⁺ 및 CD10⁺이고, 항체 결합 및 RT-PCR 모두에 의해 결정된 바와 같이 CD117⁻인 태반 줄기 세포를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁺, HLA 클래스 I⁻ 및 β -2-마이크로글로불린⁻인 태반 줄기 세포를 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 1가지 이상의 마커의 발현이 중간엽 줄기 세포 (예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포)에 대한 것보다 2배 이상 더 높은 태반 줄기 세포를 제공한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 분리된 태반 줄기 세포는 기원이 비-모체이다. 또다른 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 상기 분리된 집단 내의 상기 세포의 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상은 기원이 비-모체이다.

[0083] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 알데히드 탈수소효소 활성 분석법에 의해 평가했을 때 다수의 태반 줄기 세포가 알데히드 탈수소효소 (ALDH)에 대해 양성인, 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 제공한다. 이같은 분석법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, [Bostian and Berts, Biochem. J., 173, 787, (1978)] 참조). 특정 실시양태에서, 상기 ALDH 분석법은 ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Ashland, Oregon)를 알데히드 탈수소효소 활성의 마커로 사용한다. 특정 실시양태에서, 상기 다수는 상기 세포 집단 내의 세포의 약 3% 내지 약 25%이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 ALDEFLUOR®를 알데히드 탈수소효소 활성의 지표로 사용하는 알데히드 탈수소효소 활성 분석법에 의해 평가했을 때 다수의 제대 줄기 세포가 알데히드 탈수소효소에 대해 양성인, 제대 줄기 세포의 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 다수는 상기 세포 집단 내의 세포의 약 3% 내지 약 25%이다. 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포 또는 제대 줄기 세포의 상기 집단은 세포수가 동일하고 동일한 조건 하에 배양된 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 집단보다 3배 이상, 또는 5배 이상 더 높은 ALDH 활성을 나타낸다.

[0084] 본 발명은 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포의 집단이 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 또는 20회, 또는 이를 초과하여 계대되었거나, 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 20회, 22회, 24회, 26회, 28회, 30회, 32회, 34회, 36회, 38회 또는 40회 또는 이를 초과하는 개체수 배가로 확장된, 상기 태반 줄기 세포, 또는 태반 줄기 세포 집단 중 임의의 것을 제공한다.

[0085] 상기 태반 세포 또는 세포 집단 중 임의의 것의 특정 실시양태에서, 세포, 또는 상기 집단 내의 세포의 적어도 약 95% 또는 약 99%의 핵형이 정상이다. 상기 태반 세포 또는 세포 집단 중 임의의 것의 또다른 특정 실시양태에서, 세포, 또는 세포 집단 내의 세포는 기원이 비-모체이다.

[0086] 임의의 상기 마커 조합을 지니는, 분리된 태반 줄기 세포, 또는 분리된 태반 줄기 세포 집단이 임의의 비율로 조합될 수 있다. 본 발명은 태반 줄기 세포 집단을 형성하기 위한 상기 태반 줄기 세포 집단들 중 임의의 2가지 이상의 분리 또는 강화를 또한 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 상기 기술된 마커 조합들 중 하나에 의해 정의되는 태반 줄기 세포의 제1 집단 및 또다른 상기 기술된 마커 조합에 의해 정의되는 태반 줄기 세포의 제2 집단을 포함하고, 이때 상기 제1 집단과 제2 집단이 약 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 또는 약 99:1의 비율로 조합되는, 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 제공한다. 유사한 방식으로, 상기 기술된 태반 줄기 세포 또는 태반 줄기 세포 집단 중 임의의 3가지, 4가지, 5가지 또는 그 이상이 조합될 수 있다.

[0087] 본 발명은 효소성 소화와 함께 또는 효소성 소화 없이 태반 조직의 파괴에 이어서 배양 (섹션 5.2.3 참조) 또는 관류 (섹션 5.2.4 참조)에 의해 수득된 태반 줄기 세포를 추가로 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 제대혈이 배수되고 나머지 혈액을 제거하도록 관류된 포유류 태반을 관류시키는 단계; 상기 태반을 관류 용액으로 관류시키는 단계; 및 상기 관류 용액을 수집하고, 이때 관류 후의 상기 관류 용액이 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 포함하는 단계; 및 상기 세포 집단으로부터 다수의 상기 태반 줄기 세포를 분리하는 단계를 포함하는 방법에 따라 생산된, 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, 관류 용액은 배꼽 정맥 및 배꼽 동맥 모두에 통과되고, 태반으로부터 삼출된 후 수집된다. 이러한 방법에 의해 생산된 태반 줄기 세포의 집단은 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물을 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 관류 용액이

배꼽 정맥에 통과되고 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 또는 배꼽 동맥에 통과되고 배꼽 정맥으로부터 수집된다. 이러한 방법에 의해 생산된 태반 줄기 세포의 집단은 전형적으로 기원이 실질적으로 배타적으로 태아이다; 즉, 예를 들어, 집단 내의 태반 줄기 세포의 90%, 95%, 99%, 또는 99.5% 초과가 기원이 태아이다.

[0088] 다양한 실시양태들에서, 태반의 관류로부터 수득된 세포 집단 내에 함유된 태반 줄기 세포는 상기 태반 세포 집단의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 이상 또는 99.5%이다. 또다른 특정 실시양태에서, 관류에 의해 수집된 태반 줄기 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 관류에 의해 수집된 태반 줄기 세포는 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 적어도 99.5% 태아 세포이다.

[0089] 또다른 특정 실시양태에서, 본 발명은 관류에 의해 수집된 분리된 태반 줄기 세포 집단을 포함하고, 이때 조성물이 태반 줄기 세포를 수집하는데 사용된 관류 용액의 적어도 일부분을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0090] 본 발명은 태반 조직을 조직-과괴 효소로 소화시켜 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 수득하는 단계, 및 다수의 태반 줄기 세포를 나머지 상기 태반 세포로부터 분리하는 단계를 포함하는 방법에 따라 생산된, 본원에 기술된 태반 줄기 세포의 분리된 집단을 추가로 제공한다. 전체 태반 또는 이의 임의의 일부가 소화되어 태반 줄기 세포를 수득할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 상기 태반 조직은 전체 태반, 양막, 융모막, 양막 및 융모막의 조합물, 또는 임의의 상기의 것들의 조합물이다. 또다른 특정 실시양태에서, 조직-과괴 효소는 트립신 또는 콜라게나제이다. 다양한 실시양태들에서, 태반을 소화시킴으로써 수득된 세포 집단 내에 함유된 태반 줄기 세포는 상기 태반 세포 집단의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 적어도 99.5%이다.

[0091] 유전자 프로파일링(profiling)으로, 분리된 태반 줄기 세포, 및 분리된 태반 줄기 세포의 집단이 다른 세포, 예를 들어, 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 줄기 세포로부터 구별가능하다는 것이 확인되었다. 본원에 기술된 태반 줄기 세포는 골수-유래 중간엽 줄기 세포와 비교하여 태반 줄기 세포 또는 체대 줄기 세포에 대해 특이적으로 발현되는 1가지 이상의 유전자의 발현을 기초로 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수 있다. 특히, 태반 줄기 세포는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, 또는 임의의 상기의 것의 조합물인 1가지 이상의 유전자의 발현이 중간엽 줄기 세포보다 태반 줄기 세포에서 유의하게 더 높은 (즉, 2배 이상 더 높은) 것을 기초로 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수 있고, 이때 이러한 유전자들의 발현은, 줄기 세포들이 동등한 조건 하에 배양되는 경우, 골수-유래 줄기 세포보다 태반 줄기 세포 또는 체대 줄기 세포에서 더 높다. 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포-특이적 또는 체대 줄기 세포-특이적 유전자는 CD200이다.

[0092] 이러한 유전자들의 발현 수준은 태반 세포의 집단의 신원을 입증하는 것, 적어도 다수의 태반 줄기 세포를 포함하는 것으로 세포 집단을 확인하는 것 등에 사용될 수 있다. 신원이 입증된, 태반 줄기 세포의 집단은 클론성일 수 있고, 예를 들어, 단일 태반 줄기 세포로부터 확장된 태반 줄기 세포의 집단, 또는 줄기 세포의 혼합형 집단, 예를 들어, 다중 태반 줄기 세포로부터 확장된 태반 줄기 세포들만을 포함하는 세포의 집단, 또는 태반 줄기 세포 및 1가지 이상의 다른 유형의 세포를 포함하는 세포의 집단일 수 있다.

[0093] 이러한 유전자들의 발현 수준은 태반 줄기 세포의 집단을 선별하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 중간엽 줄기 세포의 동등한 집단에서보다 1가지 이상의 이러한 유전자의 발현이 세포의 집단으로부터의 샘플에서 유의하게 더 높은 경우 세포의 집단, 예를 들어, 클론-확장 세포들이 선별된다. 이같은 선별은 다수의 태반 줄기 세포 집단, 신원이 알려지지 않은 다수의 세포 집단 등으로부터의 집단의 선별일 수 있다.

[0094] 태반 줄기 세포를 1가지 이상의 이같은 유전자의 발현 수준을 기초로 중간엽 줄기 세포 대조군에서의 상기 1가지 이상의 유전자의 발현 수준과 비교하여 선별할 수 있다. 한 실시양태에서, 동등한 갯수의 중간엽 줄기 세포를 포함하는 샘플에서의 상기 1가지 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군으로 사용된다. 또다른 실시양태에서, 특정 조건 하에 테스트된 태반 줄기 세포에 대한 대조군은 상기 조건 하에서의 중간엽 줄기 세포에서의 상기 1가지 이상의 유전자의 발현 수준을 나타내는 수치이다.

[0095] 본 발명의 태반 줄기 세포는 1차 배양에서, 또는 60% DMEM-LG (Gibco), 40% MCDB-201 (Sigma), 2% 소 태아 혈청 (FCS) (Hyclone Laboratories), 1× 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS), 1× 레놀렌산-소 혈청-알부민 (LA-BSA), 10^{-9} M 텍사메타손 (Sigma), 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (Sigma), 표피 성장 인자 (EGF) 10 ng/ml

(R&D Systems), 혈소판 유래-성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems) 및 100 U 페니실린/1000 U 스트렙토마이신을 포함하는 배지에서 증식 동안, 상기 특성 (예를 들어, 세포 표면 마커 및/또는 유전자 발현 프로파일의 조합)을 디스플레이한다.

[0096] 상기 기술된 태반 줄기 세포의 단리된 집단, 및 태반 줄기 세포의 집단은 일반적으로 약, 적어도 또는 최대 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 또는 그 이상의 태반 줄기 세포를 포함한다.

[0097] 5.1.3 배양에서의 성장

[0098] 본원에 기술된 태반 줄기 세포의 성장은, 임의의 포유류 세포에 대해서와 같이, 성장에 선택된 특정 배지에 부분적으로 좌우된다. 최적의 조건 하에, 태반 줄기 세포는 전형적으로 3-5일 내에 수가 배가된다. 배양 동안, 본 발명의 태반 줄기 세포는 배양 중의 기관, 예를 들어 조직 배양 컨테이너 (예를 들어, 조직 배양 접시, 플라스틱, 피브로넥틴-코팅 플라스틱 등)의 표면에 부착하여, 단층을 형성한다.

[0099] 본 발명의 태반 줄기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단은, 적합한 조건 하에 배양될 때, 배양체-유사체를 형성하고, 즉, 세포의 3차원 클러스터가 부착성 줄기 세포층의 상부에서 성장한다. 배양체-유사체 내의 세포는 극초기 줄기 세포와 관련된 마커, 예를 들어, OCT-4, Nanog, SSEA3 및 SSEA4를 발현한다. 전형적으로 배양체-유사체 내의 세포는 본원에 기술된 태반 줄기 세포가 배양 기관에 부착성인 것과 같이 부착성이지만, 배양 동안 이러한 부착성 세포에 계속 부착된다. 배양체-유사체 세포는 생육력에 대해 부착성 태반 줄기 세포에 의존적인데, 부착성 줄기 세포의 부재 하에 배양체-유사체가 형성되지 않기 때문이다. 따라서 부착성 태반 줄기 세포는 부착성 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 성장을 용이하게 한다. 이론에 구속되기를 원치 않으면서, 배아 줄기 세포가 세포의 영양세포(feeder) 층 상에서 성장하는 것과 같이 배양체-유사체의 세포가 부착성 태반 줄기 세포 상에서 성장하는 것으로 생각된다. 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포에서는 배양에서 배양체-유사체가 발생하지 않는다.

[0100] 5.2 태반 줄기 세포를 수득하는 방법

[0101] 5.2.1 줄기 세포 수집 조성물

[0102] 본 발명은 태반 줄기 세포를 수집하고 단리하는 방법을 추가로 제공한다. 일반적으로, 줄기 세포는 생리학적으로 허용가능한 용액, 예를 들어, 줄기 세포 수집 조성물을 사용하여 포유류 태반으로부터 수득된다. 줄기 세포 수집 조성물은 발명의 명칭이 "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs"인 관련된 미국 특허 가출원 번호 60/754,969 (2005년 12월 29일 출원)에 상세하게 기술되어 있다.

[0103] 줄기 세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양에 적절한 임의의 생리학적으로 허용가능한 용액, 예를 들어, 염수 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수, 크랩(Kreb) 용액, 변형 크랩 용액, 이글(Eagle) 용액, 0.9 % NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0104] 줄기 세포 수집 조성물은 태반 줄기 세포를 보존하는 경향이 있는, 즉, 사망으로부터 태반 줄기 세포를 보호하는 것, 또는 수집 시간에서 배양 시간까지 태반 줄기 세포의 사망을 지연시키는 것, 사망하는 세포 집단 내의 태반 줄기 세포의 수를 감소시키는 것 등의 경향이 있는 1가지 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이같은 성분은, 예를 들어, 세포자멸사 억제제 (예를 들어, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제 (예를 들어, 황산마그네슘, 항고혈압 약물, 심방 나트륨이노 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 소듐 니트로프러시드, 히드랄라진, 아데노신 트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포디에스테라제 억제제 등); 괴사 억제제 (예를 들어, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카르바메이트, 또는 클로나제팜); TNF- α 억제제; 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0105] 줄기 세포 수집 조성물은 1가지 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, RNA분해효소, 또는 DNA분해효소 등을 포함할 수 있다. 이같은 효소에는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리디움 히스토리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 썬모라이신, 엘라스타제, 트립신, 리베라제(LIBERASE), 히알루로니다제 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0106] 줄기 세포 수집 조성물은 살균 유효량 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 비-제한적인 특정 실시양

태에서, 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, 오픈록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시양태에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 박테리아, 예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.

[0107] 줄기 세포 수집 조성물은 1가지 이상의 하기 화합물을 또한 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 (한 실시양태에서, 내피 통합성 및 세포 생존력을 유지하는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 합성 또는 천연 발생 콜로이드, 다당류 예컨대 텍스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜 (약 25 g/l 내지 약 100 g/l, 또는 약 40 g/l 내지 약 60 g/l 으로 존재)); 항산화제 (예를 들어, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 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 도입을 방지하는 작용제 (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 (한 실시양태에서, 잔류 혈액의 응고를 방지하는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 헤파린 또는 히루딘 (약 1000 유닛/l 내지 약 100,000 유닛/l 로 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)).

[0108] 5.2.2 태반의 수집 및 취급

[0109] 일반적으로, 인간 태반은 출산 후 이의 만출 직후에 회수된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 환자로부터 사전 동의 후에, 그리고 이 환자의 완전한 병력을 취하여 태반과 관련시킨 후에 회수된다. 바람직하게는, 병력이 분만 이후에 계속된다. 이같은 병력은 태반 또는 이로부터 수득된 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 개인화된 의학에 사용될 수 있다.

[0110] 태반 줄기 세포의 회수 전에, 제대혈 및 태반 혈액이 제거된다. 특정 실시양태에서, 분만 후, 태반 내의 제대혈이 제거된다. 태반에 통상적인 제대혈 회수 공정이 적용될 수 있다. 전형적으로, 바늘 또는 캐눌러(cannula)가, 중력의 보조와 함께, 태반을 방혈시키는데 사용된다 (미국 특허 번호 5,372,581 (Anderson), 미국 특허 번호 5,415,665 (Hessel 등) 참조). 바늘 또는 캐눌러는 일반적으로 제대 정맥에 놓이고, 태반으로부터 제대혈이 배수되는 것을 돕도록 태반이 부드럽게 마사지될 수 있다. 이같은 제대혈 회수는 상업적으로, 예를 들어 LifeBank USA, Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry 및 Cryocell에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 제대혈 회수 동안의 조직 파괴를 최소화하도록 태반이 추가적인 조작 없이 중력에 의해 배수된다.

[0111] 전형적으로, 제대혈의 회수 및 줄기 세포의 수집을 위해 (예를 들어, 관류 또는 조직 해리에 의해), 태반은 분만실 또는 출산실에서 또다른 장소, 예를 들어 실험실로 수송된다. 바람직하게는 태반은 무균성의 단열 수송 장치 (태반의 온도를 20℃ 내지 28℃ 사이에서 유지시킴)에서 수송되고, 예를 들어, 태반을 집게로 집은 근위부 제대와 함께 무균성 zip-락(zip-lock) 플라스틱 백에 놓은 후, 이를 단열 컨테이너에 놓는다. 또다른 실시양태에서, 실질적으로 계류 중인 미국 특허 번호 7,147,626에 기술된 바와 같이 제대혈 수집 키트 내에서 태반이 수송된다. 바람직하게는, 태반은 분만 후 4시간 내지 24시간 내에 실험실로 수송된다. 특정 실시양태에서, 근위부 제대가, 바람직하게는 태반 원반 내로의 삽입의 4-5 cm 이내에서, 제대혈 회수 전에 집게로 집어진다. 또다른 실시양태에서, 근위부 제대는 제대혈 회수 후에, 그러나 태반의 추가적인 프로세싱 전에 집게로 집어진다.

[0112] 태반은, 줄기 세포 수집 전에, 무균성 조건 하에 실온 또는 5 내지 25℃의 온도에서 보관될 수 있다. 태반은 임의의 잔류 제대혈을 제거하기 위해 태반을 관류하기 전에 4시간 내지 24시간, 48시간 이하, 또는 48시간을 초과하는 시간의 기간 동안 보관될 수 있다. 한 실시양태에서, 태반은 만출 후 약 0시간 내지 약 2시간에 수확된다. 바람직하게는 태반은 5 내지 25℃ (섭씨)의 온도에서 항응고제 용액 내에서 보관된다. 적절한 항응고제 용액은 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와파린 소듐(warfarin sodium)이 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액 (예를 들어, 1:1000 용액 내의 1% w/w)을 포함한다. 바람직하게는, 방혈된 태반이 36시간 이하 동안 보관된 후, 태반 줄기 세포가 수집된다.

[0113] 일단 일반적으로 상기와 같이 수집 및 제조되면, 포유류 태반 또는 이의 일부분을 임의의 당업계에 공지된 방식

으로 처리할 수 있고, 예를 들어, 관류 또는 파괴할 수 있고, 예를 들어, 1가지 이상의 조직-파괴 효소로 소화시켜, 줄기 세포를 수득할 수 있다.

[0114] 5.2.3 태반 조직의 물리적 파괴 및 효소성 소화

[0115] 한 실시양태에서, 줄기 세포가 포유류 태반으로부터 이 장기 모두의 일부부의 물리적 파괴에 의해 수집된다. 예를 들어, 태반, 또는 이의 일부분을 예를 들어 압착하거나, 전단시키거나, 다지거나, 주사위꼴로 자르거나, 잘게 자르거나, 침연시킬 수 있다. 그 후, 조직을 배양하여 줄기 세포의 집단을 수득한다. 전형적으로, 태반 조직을 줄기 세포 수집 조성물을 사용하여, 예를 들어, 이러한 조성물 내에서 파괴한다 (섹션 5.2.1 및 하기 참조).

[0116] 물리적 파괴 및/또는 효소성 소화 및 줄기 세포 회수 전에 태반이 구성요소들로 절개될 수 있다. 태반 줄기 세포는 양막, 융모막, 제대, 태반엽, 또는 이들의 임의의 조합물의 전체 또는 일부분으로부터 수득될 수 있다. 바람직하게는, 태반 줄기 세포는 양막 및 융모막을 포함하는 태반 조직으로부터 수득된다. 전형적으로, 태반 줄기 세포는 태반 조직의 소형 덩어리, 예를 들어 부피가 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 약 1000 mm³인 태반 조직의 덩어리의 파괴에 의해 수득될 수 있다. 임의의 물리적 파괴 방법이 사용될 수 있고, 단 파괴 방법은, 예를 들어, 트리판 블루 배제에 의해 결정되는 바와 같이, 상기 장기 내의 세포의 다수, 더욱 바람직하게는 대다수, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 생육성하도록 한다.

[0117] 일반적으로 줄기 세포는 태반 또는 이의 일부분으로부터 만출 후 약 3일 이내의 임의의 시간에 수집될 수 있지만, 바람직하게는 만출 후 약 8시간 내지 약 18시간 사이에 수집된다.

[0118] 특정 실시양태에서, 파괴된 조직이 태반 줄기 세포의 증식에 적절한 조직 배양 배지에서 배양된다 (예를 들어, 태반 줄기 세포의 배양이 기술된 하기의 섹션 5.3 참조).

[0119] 또다른 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 1가지 이상의 조직-소화 효소를 사용함으로써 달성될 수 있는 효소성 소화를 포함하는 태반 조직의 물리적 파괴에 의해 수집된다. 또한 태반, 또는 이의 일부분이 물리적으로 파괴되고 1가지 이상의 효소로 소화된 후, 생성된 물질이 줄기 세포 수집 조성물에 함침되거나, 이러한 조성물 내로 혼합될 수 있다.

[0120] 바람직한 줄기 세포 수집 조성물은 1가지 이상의 조직 파괴성 효소(들)를 포함한다. 바람직하게는 효소성 소화는 효소들의 조합물, 예를 들어 매트릭스 메탈로프로테아제 및 중성 프로테아제의 조합물, 예를 들어, 콜라게나제 및 디스파제의 조합물을 사용한다. 한 실시양태에서, 태반 조직의 효소성 소화는 매트릭스 메탈로프로테아제, 중성 프로테아제 및 히알루론산의 소화를 위한 점액용해 효소의 조합물, 예컨대 콜라게나제, 디스파제 및 히알루로니다제의 조합물, 또는 리베라제(LIBERASE) (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) 및 히알루로니다제의 조합물을 사용한다. 태반 조직을 파괴하는데 사용될 수 있는 기타 효소에는 파파인, 데옥시리보뉴클레아제, 세린 프로테아제, 예컨대 트립신, 키모트립신, 또는 엘라스타제가 포함된다. 세린 프로테아제는 혈청 내의 알파 2 마이크로글로불린에 의해 억제될 수 있고, 따라서 소화에 사용된 배지는 일반적으로 혈청이 없다. EDTA 및 DNA분해효소가 효소 소화 절차에서 통상적으로 사용되어 세포 회수 효율을 증가시킨다. 점성 소화물 내에 줄기 세포가 포획되는 것을 방지하도록 바람직하게는 소화물이 희석된다.

[0121] 조직 소화 효소의 임의의 조합물이 사용될 수 있다. 조직 소화 효소에 대한 전형적인 농도에는, 예를 들어, 콜라게나제 I 및 콜라게나제 IV에 대한 50-200 유닛/ml, 디스파제에 대한 10 유닛/ml, 엘라스타제에 대한 10-100 유닛/ml가 포함된다. 프로테아제는 조합되어, 즉 2가지 이상의 프로테아제가 동일한 소화 반응에서 사용될 수 있거나, 또는 태반 줄기 세포를 유리시키기 위해 순차적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 태반 또는 이의 일부분이 먼저 약 1 내지 약 2 mg/ml의 적절한 양의 콜라게나제 I로 예를 들어 30분 동안 소화된 후, 약 0.25% 농도의 트립신으로 예를 들어 10분 동안 37°C에서 소화된다. 바람직하게는 세린 프로테아제는 다른 효소의 사용 후에 이어서 사용된다.

[0122] 또다른 실시양태에서, 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포 수집 조성물, 또는 줄기 세포 수집 조성물로의 줄기 세포의 단리 전에 조직이 파괴 및/또는 소화된 용액에 킬레이트제, 예를 들어, 에틸렌 글리콜 비스(2-아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 첨가함으로써 조직이 추가로 파괴될 수 있다.

[0123] 한 실시양태에서, 소화가 하기와 같이 진행될 수 있다. 약 1 g의 태반 조직을 수득하여 다진다. 조직을 약 100 RPM의 셰이커에서 약 37°C에서 약 1 mg/ml 콜라게나제 1A 및 약 0.25% 트립신을 포함하는 용액 10 ml에서

소화시킨다. 소화물을 배양 배지로 3회 세정하고, 세정된 세포를 2개의 T-75 플라스크 내로 과중한다. 이어서 세포를 차등 부착에 의해 분리하고, 예를 들어, 생육력, 세포 표면 마커, 분화 등에 대해 특성화한다.

[0124] 전체 태반, 또는 태아 및 모체 세포 모두를 포함하는 태반의 일부분의 경우 (예를 들어, 태반의 일부분이 융모막 또는 태반엽을 함유하는 경우), 수집된 태반 줄기 세포는 태아 및 모체 양쪽에서 유래된 태반 줄기 세포의 혼합물을 포함할 것으로 이해될 것이다. 모체 세포를 포함하지 않거나 무시할 수 있는 갯수의 모체 세포를 포함하는 태반의 일부분 (예를 들어, 양막)의 경우, 수집된 태반 줄기 세포는 거의 배타적으로 태아 태반 줄기 세포를 포함할 것이다.

[0125] 차등 트립신처리 (하기 섹션 5.2.5 참조)에 이은 신선한 증식 배지 내에서의 1가지 이상의 새로운 배양 컨테이너에서의 배양 (임의로 2차 차등 트립신처리 단계가 이어짐)에 의해 줄기 세포가 파괴된 조직으로부터 분리될 수 있다.

[0126] 5.2.4 태반 관류

[0127] 포유류 태반의 관류에 의해 태반 줄기 세포가 또한 수득될 수 있다. 포유류 태반을 관류하여 줄기 세포를 수득하는 방법이, 예를 들어, 미국 출원 공보 번호 2002/0123141 (Hariri), 및 발명의 명문 명칭이 "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs"인 관련된 미국 가출원 번호 60/754,969 (2005년 12월 29일 출원)에 개시되어 있다.

[0128] 관류 용액으로 줄기 세포 수집 조성물을 예를 들어 사용하여, 태반 혈관계를 예를 들어 통과하는 관류에 의해, 태반 줄기 세포가 수집될 수 있다. 한 실시양태에서, 배꼽 동맥과 배꼽 정맥 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 관류 용액을 통과시킴으로써 포유류 태반이 관류된다. 태반을 통과하는 관류 용액의 흐름은 태반 내로의 중력 흐름을 예를 들어 사용하여 달성될 수 있다. 바람직하게는, 펌프, 예를 들어, 연동(peristaltic) 펌프를 사용하여 태반을 통과하도록 관류 용액을 밀어 넣는다. 예를 들어, 배꼽 정맥에 무균성 연결 기구, 예컨대 무균성 튜빙(tubing)에 연결된캐놀러, 예를 들어, 테플론(TEFLO)® 또는 플라스틱 캐놀러가 끼힐 수 있다. 무균성 연결 기구는 관류 매니폴드(manifold)에 연결된다.

[0129] 관류에 대비하여, 바람직하게는 태반은 배꼽 동맥 및 배꼽 정맥이 태반의 최고점에 위치하는 방식으로 놓인다 (예를 들어, 매달린다). 태반 혈관계 및 주변 조직에 관류 유체를 통과시킴으로써 태반이 관류될 수 있다. 관류 유체를 배꼽 정맥에 통과시키고 배꼽 동맥으로부터 수집함으로써, 또는 관류 유체를 배꼽 동맥에 통과시키고 배꼽 정맥으로부터 수집함으로써, 태반이 또한 관류될 수 있다.

[0130] 한 실시양태에서, 예를 들어, 배꼽 동맥 및 배꼽 정맥이 동시에, 예를 들어, 가요성 연결부를 통해 관류 용액의 저장소에 연결된 피켓에 연결된다. 관류 용액이 배꼽 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액이 태반의 주변 조직 내로 혈관의 벽으로부터 삼출되고/되거나 이러한 벽을 통과하고, 임신 동안 어머니의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터의 적절한 개방형 용기에 수집된다. 또한 관류 용액이 체대 개구부를 통해 도입되어, 모체의 자궁 벽과 계면한 태반의 벽 내의 개구부에서 흘러 나오거나 스며나오게 될 수 있다. "팬(pan)" 방법으로 칭해질 수 있는 이러한 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

[0131] 또다른 실시양태에서, 관류 용액은 배꼽 정맥을 통과하여 배꼽 동맥으로부터 수집되거나, 또는 배꼽 동맥을 통과하여 배꼽 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로(closed circuit)" 방법으로 칭해지는 이러한 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 배타적으로 태아 세포이다.

[0132] 팬 방법을 사용하는 관류, 즉 관류액이 모체 측면으로부터 산출된 후 수집되는 관류로 태아 및 모체 세포의 혼합물이 생성된다는 것이 이해될 것이다. 그 결과, 이러한 방법에 의해 수집된 세포는 태아 및 모체 기원 양쪽 모두의 태반 줄기 세포의 혼합 집단을 포함한다. 반면에, 관류 유체가 1개 또는 2개의 태반 혈관을 통과하여 나머지 혈관(들)을 통과하여 단독으로 수집되는, 폐쇄 회로 방법에서의 태반 혈관계만을 통한 관류로는 거의 배타적으로 태아 기원의 태반 줄기 세포의 집단이 수집된다.

[0133] 폐쇄 회로 관류 방법이, 한 실시양태에서, 하기와 같이 수행될 수 있다. 분만 후의 태반을 출산 후 약 48시간 이내에 수득한다. 체대를 집게로 집고, 집게 위로 절단한다. 체대를 폐기할 수 있거나, 또는 체대 줄기 세포를 예를 들어 회수하기 위해 및/또는 생체재료의 생산을 위해 체대막을 프로세싱하기 위해 프로세싱할 수 있다. 양막이 관류 동안 유지될 수 있거나, 또는, 예를 들어, 손가락으로의 비절개 박리를 사용하여, 융모막으로부터 분리될 수 있다. 양막이 관류 전에 융모막으로부터 분리되는 경우, 이는 예를 들어 폐기될 수 있거나 또는 프로세싱될 수 있고, 예를 들어, 효소성 소화에 의해 줄기 세포를 수득하기 위해, 또는 양막 생체재료, 예를 들어, 미국 출원 공보 번호 2004/0048796에 기술된 생체재료를 예를 들어 생산하기 위해, 프로세싱될 수 있다.

태반의 모든 눈에 보이는 혈병 및 잔류 혈액을, 예를 들어, 무균성 거즈를 사용하여, 깨끗이 한 후, 예를 들어, 제대막을 부분적으로 절단하여 제대의 단면을 노출시킴으로써, 제대 혈관을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들어, 단힌 악어입 집게를 각각의 혈관의 절단 끝부분을 통해 전진시킴으로써, 개방시킨다. 이어서, 관류 기구 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 튜빙과 같은 장치를 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적절한 임의의 펌프, 예를 들어, 연동 펌프일 수 있다. 그 후, 무균성 수집 저장소, 예를 들어, 250 ml 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입한다. 별법적으로, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입하고, 수집 저장소(들)에 대한 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 양쪽 모두에 삽입한다. 그 후, 태반을 다량의 관류 용액, 예를 들어, 약 750 ml의 관류 용액으로 관류한다. 그 후 관류액 내의 세포를, 예를 들어, 원심분리에 의해, 수집한다.

[0134] 한 실시양태에서, 근위부 제대를 관류 동안 집게로 잡고, 더욱 바람직하게는 태반 원반 내로의 제대의 삽입의 4-5 cm 이내에서 집게로 잡는다.

[0135] 방혈 과정 동안 포유류 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 무색이게 된다. 일반적으로, 30 내지 100 ml의 관류 유체가 초기에 태반을 방혈시키는데 적절하지만, 관찰된 결과에 따라 더 많거나 더 적은 관류 유체가 사용될 수 있다.

[0136] 태반 줄기 세포를 수집하는데 사용된 관류 액체의 양은 수집되는 줄기 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반에서 이루어질 수집 횟수 등에 따라 변할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 관류 액체의 양은 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 후 700-800 ml의 관류 액체로 관류된다.

[0137] 태반을 수 시간 또는 수 일에 걸쳐 여러번 관류할 수 있다. 여러 번 관류되는 경우, 태반이 컨테이너 또는 기타 적절한 용기에서 무균 조건 하에 유지 또는 배양될 수 있고, 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와파린 소듐, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)와 함께 또는 없이, 및/또는 항균제 (예를 들어, β -메르캅토에탄올 (0.1 mM); 항생제 예컨대 스트렙토마이신 (예를 들어, 40-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 페니실린 (예를 들어, 40 U/ml), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$))와 함께 또는 없이, 표준 관류 용액 (예를 들어, 포스페이트 완충 염수 ("PBS")와 같은 생리식염수) 또는 줄기 세포 수집 조성물로 관류될 수 있다. 한 실시양태에서, 관류 및 관류물의 수집 전에 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, 단리된 태반이 관류물을 수집하지 않으면서 일정 기간 동안 유지 또는 배양된다. 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 24 시간, 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, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 관류될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어, 줄기 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 유핵 세포 수가 100개의 세포/ml 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 상이한 시점의 관류액들을 개별적으로 추가적으로 프로세싱하여, 세포, 예를 들어, 줄기 세포의 시간-의존적 집단을 회수할 수 있다. 상이한 시점으로부터의 관류액들을 또한 풀링(pooling)할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 줄기 세포는 만출 후 약 8시간 내지 약 18시간 사이에 한번에 또는 여러번 수집된다.

[0138] 임의의 이론에 구속되기를 원치 않으면서, 태반의 방혈 및 충분한 시간의 관류 후, 태반 줄기 세포는 태반의 방혈 및 관류된 미세순환 내로 이동하는 것으로 여겨지고, 여기서 본 발명의 방법에 따라, 바람직하게는 관류에 의해 수집 용기 내로 세정함으로써, 태반 줄기 세포가 수집된다. 단리된 태반의 관류는 잔류 제대혈을 제거하는 것뿐만 아니라, 태반에 산소가 포함되는 적절한 영양소를 제공하는 작용을 한다. 바람직하게는, 항응고제를 첨가하지 않으면서, 잔류 제대혈 세포를 제거하는데 사용된 유사한 용액으로 태반을 배양 및 관류할 수 있다.

[0139] 본 발명의 방법에 따른 관류로 상기 용액으로 관류되지 않았고, 줄기 세포를 수득하도록 다른 방식 (예를 들어, 조직 파괴, 예를 들어 효소성 소화)으로 처리되지도 않은 포유류 태반으로부터 수득가능한 수보다 유의하게 더 많은 태반 줄기 세포가 수집된다. 이러한 상황에서, "유의하게 더 많은"은 10% 이상 더 많은 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 따른 관류로, 예를 들어, 태반 또는 이의 일부분이 배양된 배양 배지로부터 수득가능한 태반 줄기 세포의 수보다, 유의하게 더 많은 태반 줄기 세포가 산출된다.

[0140] 1가지 이상의 프로테아제 또는 기타 조직 파괴성 효소를 포함하는 용액으로의 관류에 의해 태반으로부터 줄기 세포가 단리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 태반 또는 이의 일부분 (예를 들어 양막, 양막 및 융모막, 태반

소엽 또는 태반엽 혹은 임의의 상기의 것들의 조합)를 25-37℃로 만들고, 1가지 이상의 조직 파괴성 효소와 함께 200 ml의 배양 배지에서 30 분 동안 인큐베이션한다. 관류액으로부터의 세포를 수집하고, 4℃로 만들고, 5 mM EDTA, 2 mM 디티오프레이트 및 2 mM 베타-메르캅토에탄올을 포함하는 저온 억제제 혼합물로 세정한다. 수분 후 줄기 세포를 저온 (예를 들어 4℃)의 줄기 세포 수집 조성물로 세정한다.

[0141] 5.2.5 태반 줄기 세포의 단리, 분류 및 특성화

[0142] 관류에 의해 수득되었는지 또는 효소성 소화에 의해 수득되었는지, 초기에 포유류 태반으로부터의 줄기 세포를 피콜(Ficoll) 농도구배 원심분리에 의해 다른 세포로부터 정제할 수 있다. 이같은 원심분리는 원심분리 속도 등에 대해 임의의 표준 프로토콜을 따를 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 태반으로부터 수집된 세포가 실온에서 15분 동안의 5000×g의 원심분리에 의해 관류액으로부터 회수되고, 이는 세포를 예를 들어 잔해물 및 혈소판으로부터 분리한다. 또다른 실시양태에서, 태반 관류액을 약 200 ml로 농축하고, 부드럽게 피콜 상에 층상화하고, 22℃에서 20분 동안 약 1100×g로 원심분리하여, 세포의 저밀도 계면층을 추가적인 프로세싱을 위해 수집한다.

[0143] 세포 펠렛이 신선한 줄기 세포 수집 조성물, 또는 줄기 세포 유지에 적절한 배지, 예를 들어, 2 U/ml 헤파린 및 2 mM EDTA (GibcoBRL, NY)를 함유하는 IMDM 무혈청 배지에 재현탁될 수 있다. 예를 들어, 제조업자의 권장 절차에 따라 Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway)를 사용하여, 전체 단핵 세포 분획을 단리할 수 있다.

[0144] 본원에서 사용된, 태반 줄기 세포의 "단리"는 미처리 포유류 태반에서 정상적으로 줄기 세포와 회합되는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%를 제거하는 것을 의미한다. 한 장기로부터의 줄기 세포는, 미처리 장기에서 줄기 세포와 정상적으로 회합되는 세포의 50% 미만을 포함하는 세포의 집단 내에 존재하는 경우, "단리"된 것이다.

[0145] 관류 또는 소화에 의해 수득된 태반 세포는, 예를 들어, 추가로 또는 초기에, 0.2% EDTA가 있는 0.05% 트립신 용액 (Sigma, St. Louis MO)을 예를 들어 사용하는 차등 트립신처리에 의해 단리될 수 있다. 전형적으로 태반 줄기 세포는 플라스틱 표면으로부터 약 5분 이내에 탈착되는 반면, 전형적으로 기타 부착성 집단은 20-30분을 초과하는 인큐베이션을 필요로 하기 때문에 차등 트립신처리가 가능하다. 트립신처리 및 트립신 중화 (예를 들어, 트립신 중화 용액 (TNS, Cambrex) 등을 이용)에 이어서, 탈착된 태반 줄기 세포를 수확할 수 있다. 부착성 세포를 단리하는 한 실시양태에서, 예를 들어 약 $5-10 \times 10^6$ 개의 세포의 분취량을 각각의 여러 T-75 플라스크, 바람직하게는 피브로넥틴이 코팅된 T-75 플라스크에 담는다. 이같은 실시양태에서, 세포를 시판되는 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM) (Cambrex)와 함께 배양하고, 조직 배양 인큐베이터 (37℃, 5% CO₂) 내에 놓을 수 있다. 10-15일 후, PBS로 세정함으로써 비-부착성 세포가 플라스크로부터 제거된다. 그 후, PBS를 MSCGM으로 대체한다. 바람직하게는 플라스크를 각종 부착성 세포 유형의 존재에 대해, 특히 섬유모세포양 세포의 클러스터의 확인 및 확장에 대해 매일 검사한다.

[0146] 포유류 태반으로부터 수집된 세포의 수 및 유형을, 예를 들어, 유세포측정, 세포 분류, 면역세포화학 (예를 들어, 조직 특이적 또는 세포 마커 특이적 항체로의 염색), 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 자기 활성화 세포 분류 (MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하여 형태학 및 세포 표면 마커에서의 변화를 측정하는 것에 의해, 광 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하는 세포 형태학의 검사에 의해, 및/또는 당업계에 주지된 기술, 예컨대 PCR 및 유전자 발현 프로파일링을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정하는 것에 의해, 모니터링할 수 있다. 이러한 기술들은 1가지 이상의 특정 마커에 대해 양성인 세포들을 확인하는데 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, CD34에 대한 항체를 사용하여, 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는지 여부를 상기의 기술을 사용하여 결정할 수 있다; 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는 경우, 세포는 CD34⁺이다. 마찬가지로, RT-PCR에 의해 검출가능한 충분한 OCT-4 RNA, 또는 성체 세포보다 유의하게 더 많은 OCT-4 RNA를 세포가 생산하는 경우, 세포는 OCT-4⁺이다. 세포 표면 마커 (예를 들어, CD34와 같은 CD 마커), 및 OCT-4와 같은 줄기 세포-특이적 유전자의 서열은 당업계에 주지되어 있다.

[0147] 태반 세포, 특히 피콜 분리, 차등 부착 또는 이들의 조합에 의해 단리된 세포를 형광 활성화 세포 분류기 (FACS)를 사용하여 분류할 수 있다. 형광 활성화 세포 분류 (FACS)는 입자의 형광 성질을 기초로 하는, 세포가 포함되는 입자를 분리하기 위한 주지된 방법이다 ([Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165]). 개별적인 입자들 내의 형광 모이어티의 레이저 여기로 작은 전하가 발생하여, 혼합물로부터 양성 입자와 음성 입자가 전자기적으로 분리되도록 한다. 한 실시양태에서, 세포 표면 마커-특이적인 항체 또는 리간드가 상이한 형광 표지로 표지된다. 세포가 세포 분류기를 통과하여 프로세싱되어, 사용된 항체에 결합하는 능력을 기초로 세포

가 분리되도록 한다. FACS로 분류된 입자들이 96-웰 또는 384-웰 플레이트의 개별적인 웰 내로 직접적으로 침착되어, 분리 및 클로닝을 용이하게 할 수 있다.

[0148] 한 세포 분류 계획에서, 태반으로부터의 줄기 세포가 마커 CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 및/또는 HLA-G의 발현을 기초로 분류된다. 이는 배양 시의 세포의 부착 성질을 기초로 줄기 세포를 선별하는 절차와 함께 이루어질 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포의 부착성 선별이 마커 발현을 기초로 하는 분류 전 또는 후에 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 먼저 세포가 CD34의 발현을 기초로 분류된다; CD34⁻ 세포는 유지되고, CD200⁺HLA-G⁺인 세포를 모든 다른 CD34⁻ 세포로부터 분리한다. 또다른 실시양태에서, 태반으로부터의 세포는 마커 CD200 및/또는 HLA-G의 발현을 기초로 분류된다; 예를 들어, 이러한 마커들 중 하나를 디스플레이하는 세포가 추가적인 사용을 위해 단리된다. CD200 및/또는 HLA-G를 예를 들어 발현하는 세포가, 특정 실시양태에서, 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 들어, 한 실시양태에서, 태반 세포가 CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 및 CD45의 발현 또는 발현 결여에 의해 분류되고, CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻인 태반 세포가 추가적인 사용을 위해 다른 태반 세포들로부터 단리된다.

[0149] 태반 줄기 세포 항체-매개 검출 및 분류와 관련하여, 특정 마커에 특이적인 임의의 항체를 세포의 검출 및 분류 (예를 들어, 형광-활성화 세포 분류)에 적절한 임의의 형광단 또는 기타 표지와 조합하여 사용할 수 있다. 특정 마커에 대한 항체/형광단 조합물에는 HLA-G (Serotec (Raleigh, North Carolina)으로부터 입수가 가능), CD10 (BD Immunocytometry Systems (San Jose, California)으로부터 입수가 가능), CD44 (BD Biosciences Pharmingen (San Jose, California)으로부터 입수가 가능), 및 CD105 (R&D Systems Inc. (Minneapolis, Minnesota)로부터 입수가 가능)에 대한 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 접합 모노클로날 항체; CD44, CD200, CD117, 및 CD13에 대한 피코에리트린 (PE) 접합 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); CD33 및 CD10에 대한 피코에리트린-Cy7 (PE Cy7) 접합 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 알로피코시아닌 (APC) 접합 스트렙타비딘 및 CD38에 대한 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 및 비오틴화 CD90 (BD Biosciences Pharmingen)이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 기타 항체에는 CD133-APC (Miltenyi), KDR-비오틴 (CD309, Abcam), 사이토케라틴K-Fitc (Sigma 또는 Dako), HLA ABC-Fitc (BD), HLA DRDQDP-PE (BD), β -2-마이크로글로불린-PE (BD), CD80-PE (BD) 및 CD86- APC (BD)가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0150] 사용될 수 있는 기타 항체/표지 조합물에는 CD45-PerCP (페리딘 클로로필 단백질); CD44-PE; CD 19-PE; CD10-F (플루오레세인); HLA-G-F 및 7-아미노-악티노마이신-D (7-AAD); HLA-ABC-F 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0151] 태반 줄기 세포를 피코에리트린-Cy5 (PE Cy5) 접합 스트렙타비딘 및 CD117 또는 CD133에 대한 비오틴 접합 모노클로날 항체를 예를 들어 사용하여 CD117 또는 CD133에 대해 평가할 수 있다; 그러나, 이러한 시스템을 사용하면, 세포는 비교적 높은 배경으로 인해 각각 CD117 또는 CD133에 대하여 양성으로 나타날 수 있다.

[0152] 태반 줄기 세포가 단일 마커에 대한 항체로 표지되어, 검출 및 분류될 수 있다. 또한 태반 줄기 세포가 상이한 마커들에 대한 다중 항체로 동시에 표지될 수 있다.

[0153] 한 실시양태에서, 자기 비드를 사용하여 세포를 분리할 수 있다. 자기 비드 (직경 0.5-100 μ m)에 결합하는 능력을 기초로 입자를 분류하는 방법인 자기 활성화 세포 분류 (MACS)를 사용하여 세포들을 분류할 수 있다. 특정 세포 표면 분자 또는 합텐(hapten)을 특이적으로 인식하는 항체를 공유 결합으로 부가하는 것을 포함하여, 다양한 유용한 변형이 자기 미세구에 수행될 수 있다. 그 후, 비드가 세포와 혼합되어 결합이 허용된다. 그 후, 세포를 자기장에 통과시켜, 특정 세포 표면 마커가 있는 세포를 분리해 낸다. 한 실시양태에서, 이어서 이러한 세포들을 단리하고, 추가적인 세포 표면 마커에 대한 항체에 커플링된 자기 비드와 다시 혼합한다. 세포를 자기장에 다시 통과시켜, 양쪽 항체에 결합한 세포를 단리한다. 그 후, 이같은 세포를 별도의 접시, 예컨대 클론성 단리를 위한 미량역가 접시 내로 회석할 수 있다.

[0154] 세포 형태학 및 성장 특성을 기초로 태반 줄기 세포를 또한 특성화 및/또는 분류할 수 있다. 예를 들어, 태반 세포는 배양 시 섬유모세포양 외관을 갖는 것으로 특성화되고/되거나 이러한 외관을 기초로 선별될 수 있다. 또한 태반 줄기 세포는 배양제-유사체를 형성하는 능력이 있는 것으로 특성화되고/되거나 이러한 능력을 기초로 선별될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 섬유모세포양 형상이고, CD73 및CD105를 발현하며, 배양시 1개 이상의 배양제-유사체를 형성하는 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 단리된다. 또다른 실시양태에서, 배양시

1가지 이상의 배양체-유사체를 생산하는 OCT-4⁺ 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 분리된다.

[0155] 또다른 실시양태에서, 콜로니 형성 단위 분석법에 의해 태반 줄기 세포가 확인 및 특성화될 수 있다. 콜로니 형성 단위 분석법은 MESEN CULT™ 배지 (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)와 같이 당업계에 통상적으로 공지되어 있다.

[0156] 태반 줄기 세포를 생육력, 증식 잠재력 및 수명에 대해 당업계에 공지된 표준 기술, 예컨대 트리판 블루 배제 분석법, 플루오레세인 디아세테이트 흡수 분석법, 요오드화프로피듐 흡수 분석법 (생육력 평가용); 및 티미딘 흡수 분석법, MTT 세포 증식 분석법 (증식 평가용)을 사용하여 평가할 수 있다. 수명은 연장 배양 시 개체수 배가의 최대값을 결정하는 것과 같은 당업계에 주지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0157] 당업계에 공지된 기타 기술, 예를 들어, 원하는 세포의 선택적 성장 (양성 선별), 원치 않는 세포의 선택적 파괴 (음성 선별); 예를 들어 대두 응집소와의 혼합형 집단 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 분리될 수 있다.

[0158] 5.3 태반 줄기 세포의 배양

[0159] 5.3.1 배양 배지

[0160] 분리된 태반 줄기 세포, 또는 태반 줄기 세포 집단, 또는 태반 줄기 세포가 성장해 나오는 세포 또는 태반 조직을 사용하여 세포 배양을 시작하거나 과종할 수 있다. 일반적으로 세포는 세포의 매트릭스 또는 리간드 예컨대 라미닌, 콜라겐 (예를 들어, 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴, 및 세포의 막 단백질 (예를 들어, MATRIGEL® (BD Discovery Labware, Bedford, Mass.))로 코팅되거나 코팅되지 않은, 무균성 조직 배양 용기로 옮겨진다.

[0161] 태반 줄기 세포는 당업계에서 줄기 세포의 배양에 허용가능한 것으로 인식되는 임의의 배지 및 임의의 조건에서 배양될 수 있다. 바람직하게는, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 태반 줄기 세포는, 예를 들어, ITS (인슐린-트랜스페린-셀레늄), LA+BSA (리놀레산-소 혈청 알부민), 텍스트로스, L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-1, 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM-LG (둘베코(Dulbecco) 변형 필수 배지, 저(低)-글루코스)/MCDB 201 (병아리 섬유모세포 기초 배지); 10% 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 DMEM-HG (고(高)-글루코스); 15% FBS를 포함하는 DMEM-HG; 10% FBS, 10% 말 혈청, 및 히드로코르티손을 포함하는 IMDM (이스코브(Iscove) 변형 둘베코 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, 텍스트로스, L-아스코르브산, PDGF, EGF, 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM-LG/MCDB-201이다.

[0162] 태반 줄기 세포를 배양하는데 사용될 수 있는 기타 배지에는 DMEM (고 또는 저 글루코스), 이글(Eagle) 기초 배지, 햄(Ham) F10 배지 (F10), 햄 F-12 배지 (F12), 이스코브 변형 둘베코 배지, 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM), 라이보비츠(Liebovitz) L-15 배지, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, 개선된 DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma), 및 CELL-GRO FREE가 포함된다.

[0163] 배양 배지에 혈청 (예를 들어, 소 태아 혈청 (FBS), 바람직하게는 약 2-15% (v/v); 말 혈청 (ES); 인간 혈청 (HS)); 베타 메르캅토에탄올 (BME), 바람직하게는 약 0.001% (v/v); 1가지 이상의 성장 인자, 예를 들어, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 표피 성장 인자 (EGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1), 백혈병 억제 인자 (LIF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 및 에리트로포이에틴 (EPO); L-발린이 포함되는 아미노산; 및 미생물 오염을 제어하기 위한 1가지 이상의 항생제 및/또는 항진균제, 예를 들어, 페니실린 G, 스트렙토마이신 술페이트, 암포테리신 B, 젠타마이신, 및 니스타틴이 예를 들어 포함되는 1가지 이상의 성분이 단독으로 또는 조합되어 보충될 수 있다.

[0164] 태반 줄기 세포는 표준 조직 배양 조건에서, 예를 들어, 조직 배양 접시 또는 멀티웰 플레이트에서 배양될 수 있다. 현적(hanging drop) 방법을 사용하여 태반 줄기 세포가 또한 배양될 수 있다. 이러한 방법에서, 약 5 ml의 배지 내에 태반 줄기 세포가 약 1×10^4 개의 세포/ml로 현탁되고, 배지의 1개 이상의 액적이 조직 배양 컨테이너, 예를 들어, 100 ml 페트리(Petri) 접시의 뚜껑의 내부 상에 놓인다. 액적은, 예를 들어, 단일 액적이거나, 또는 다수의 액적일 수 있다 (예를 들어, 멀티채널 피펫터(multichannel pipetter)로부터). 뚜껑을 조

심스럽게 뒤집고, 다량의 액체, 예를 들어, 접시 대기 내의 수분 함량을 유지하는데 충분한 무균성 PBS를 함유하는 바닥 접시의 상부에 놓고, 줄기 세포를 배양한다.

- [0165] 한 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 태반 줄기 세포에서 분화되지 않은 표현형을 유지하는 작용을 하는 화합물의 존재 하에 배양된다. 특정 실시양태에서, 이러한 화합물은 치환된 3,4-디히드로피리디놀[4,5-d]피리미딘이다. 더욱 특징한 실시양태에서, 화합물은 하기 화학 구조의 화합물이다:



- [0166]
- [0167] 이러한 화합물은 태반 줄기 세포, 또는 태반 줄기 세포의 집단과, 예를 들어 약 1 μM 내지 약 10 μM 사이의 농도로 접촉될 수 있다.

[0168] 5.3.2 태반 줄기 세포의 확장 및 증식

- [0169] 일단 분리된 태반 줄기 세포, 또는 줄기 세포의 분리된 집단 (예를 들어, 생체 내에서 줄기 세포 또는 줄기 세포 집단과 정상적으로 회합된 태반 세포의 50% 이상으로부터 분리된 줄기 세포 또는 줄기 세포 집단)이 수득되면, 이러한 줄기 세포 또는 줄기 세포의 집단이 시험관 내에서 증식 및 확장될 수 있다. 예를 들어, 태반 줄기 세포의 집단이 조직 배양 컨테이너, 예를 들어, 접시, 플라스크, 멀티웰 플레이트 등에서, 줄기 세포가 70-90% 전면성장으로 증식하는데 충분한 시간 동안, 즉 줄기 세포 및 이의 자손이 조직 배양 컨테이너의 배양 표면적의 70-90%를 차지할 때까지 배양될 수 있다.

- [0170] 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 태반 줄기 세포가 파종될 수 있다. 예를 들어, 세포는 저밀도 (예를 들어, 약 1,000개 내지 약 5,000개의 세포/ cm^2) 내지 고밀도 (예를 들어, 약 50,000개 이상의 세포/ cm^2)로 파종될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 공기 중 약 0 내지 약 5 부피%의 CO_2 에서 배양된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 세포는 공기 중 약 2 내지 약 25 %의 O_2 , 바람직하게는 공기 중 약 5 내지 약 20 %의 O_2 에서 배양된다. 바람직하게는 세포는 약 25 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 40 $^{\circ}\text{C}$, 바람직하게는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양된다. 바람직하게는 세포는 인큐베이터에서 배양된다. 배양 배지는 정적일 수 있거나, 또는 생물반응기를 예를 들어 사용하여 진탕될 수 있다. 바람직하게는 태반 줄기 세포는 낮은 산화성 스트레스 하에 배양된다 (예를 들어, 글루타티온, 아스코르브산, 카탈라제, 토코페롤, N-아세틸시스테인 등이 첨가됨).

- [0171] 일단 70%-90% 전면성장이 수득되면, 세포가 계대될 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 세포가 신선한 배양 배지를 함유하는 새로운 배양 컨테이너로 계대된다. 전형적으로, 새로운 배지는 줄기 세포가 제거된 배지와 동일한 유형이다. 본 발명은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 또는 20회 또는 그 이상 계대된 태반 줄기 세포의 집단을 포함한다.

[0172] 5.3.3 태반 줄기 세포 집단

- [0173] 본 발명은 태반 줄기 세포의 집단을 제공한다. 태반 줄기 세포 집단은 1개 이상의 태반으로부터 직접 분리될 수 있다; 즉, 태반 줄기 세포 집단은 관류액으로부터 수득되거나 관류액 내에 함유된, 또는 파괴된 태반 조직, 예를 들어, 태반 조직 소화물 (즉, 태반 또는 이의 일부분의 효소성 소화에 의해 수득된 세포의 수집물)로부터 수득되거나 이러한 조직 내에 함유된 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단일 수 있다. 본 발명의 분리된 태반 줄기 세포가 또한 배양 및 확장되어 태반 줄기 세포 집단이 생산될 수 있다. 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 또한 배양 및 확장되어 태반 줄기 세포 집단이 생산될 수 있다.

- [0174] 본 발명의 태반 줄기 세포 집단은 태반 줄기 세포, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 태반 줄기 세포를 포함한다. 다양한 실시양태들에서, 분리된 태반 줄기 세포 집단 내의 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%가 태반 줄기 세포이다. 즉, 태반 줄기 세포 집단은, 예를 들어, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%만큼의 비-줄기 세포를 포함할 수 있다.

- [0175] 본 발명은, 예를 들어, 특정 마커 및/또는 특정 배양 또는 형태학적 특성을 나타내는 태반 줄기 세포 (효소성 소화로부터 유래되든지 또는 관류로부터 유래되든지)를 선별함으로써, 분리된 태반 줄기 세포 집단을 생산하는

방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 본 발명은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD200 및 HLA-G를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD200 및 HLA-G를 발현하는 태반 세포를 확인하는 단계, 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD73, CD105, 및 CD200을 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD73, CD105, 및 CD200을 발현하는 태반 세포를 확인하는 단계, 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD200 및 OCT-4를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD200 및 OCT-4를 발현하는 태반 세포를 확인하는 단계, 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD73 및 CD105를 발현하며, (c) 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 태반 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD73 및 CD105를 발현하고, 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 태반 세포를 확인하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD73, CD105, 및 HLA-G를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 CD73, CD105, 및 HLA-G를 발현하는 태반 세포를 확인하는 단계, 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다. 또다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) OCT-4를 발현하며, (c) 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 태반 세포를 선별하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 OCT-4를 발현하며, 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하는 태반 세포를 확인하는 단계, 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법을 제공한다.

[0176] 이같은 세포 집단은 임의의 하기 열거된 질환 및 용태를 치료하는데 사용될 수 있다. 이같은 세포 집단은, 예를 들어, 품질 제어 방법의 일부분으로서, 태반 줄기 세포의 집단을 평가하는데 또한 사용될 수 있다.

[0177] 임의의 상기 실시양태에서, ABC-p (태반-특이적 ABC 전달체 단백질; 예를 들어, [Allikmets et al., Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)] 참조)를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계가 방법에 추가적으로 포함될 수 있다. 중간엽 줄기 세포에 예를 들어 특이적인 1가지 이상의 특성, 예를 들어, CD29의 발현, CD44의 발현, CD90의 발현, 또는 상기의 것들의 조합물의 발현을 나타내는 세포를 선별하는 단계가 또한 방법에 포함될 수 있다.

[0178] 상기 실시양태들에서, 기관은 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포의 배양 및/또는 선별이 달성될 수 있는 임의의 표면일 수 있다. 전형적으로, 기관은 플라스틱, 예를 들어, 조직 배양 플라스틱 접시 또는 멀티웰 플레이트 플라스틱이다. 조직 배양 플라스틱은 생체분자, 예를 들어, 라미닌 또는 피브로넥틴으로 코팅될 수 있다.

[0179] 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포는 세포 선별 분야에 공지된 임의의 수단에 의해 태반 줄기 세포 집단에 대해 선별될 수 있다. 예를 들어, 1가지 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 항체들을 사용하여, 예를 들어, 유세포분석 또는 FACS에서, 세포를 선별할 수 있다. 자기 비드와 조합하여 항체를 사용하여 선별이 달성될 수 있다. 특정 줄기 세포-관련 마커에 특이적인 항체는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, OCT-4 (Abcam, Cambridge, MA), CD200 (Abcam), HLA-G (Abcam), CD73 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), CD105 (Abcam; BioDesign International, Saco, ME) 등에 대한 항체. 기타 마커에 대한 항체가 또한 시판되고, 예를 들어, CD34, CD38 및 CD45에 대한 항체가, 예를 들어, StemCell Technologies 또는 BioDesign International로부터 입수가능하다.

- [0180] 단리된 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포, 또는 태반 세포가 아닌 세포를 포함할 수 있다.
- [0181] 단리된 태반 줄기 세포 집단은 비-줄기 세포 또는 비-태반 세포의 1가지 이상의 집단과 조합될 수 있다. 예를 들어, 태반 줄기 세포의 단리된 집단은 혈액 (예를 들어, 태반혈 또는 제대혈), 혈액-유래 줄기 세포 (예를 들어, 태반혈 또는 제대혈로부터 유래된 줄기 세포), 제대 줄기 세포, 혈액-유래 유핵 세포의 집단, 골수-유래 중간엽 세포, 골-유래 줄기 세포 집단, 미정제(crude) 골수, 성체 (체세포) 줄기 세포, 조직 내에 함유된 줄기 세포의 집단, 배양된 줄기 세포, 완전히 분화된 세포의 집단 (예를 들어, 연골세포, 섬유모세포, 양막 세포, 골모세포, 근육 세포, 심근 세포 등) 등과 조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 태반 줄기 세포 및 제대 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포의 집단을 제공한다. 단리된 태반 줄기 세포 집단 내의 세포는 각각의 집단 내의 전체 유핵 세포를 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 또 다른 유형의 다수의 세포와 조합될 수 있다. 단리된 태반 줄기 세포 집단 내의 세포는 다수의 세포 유형의 다수의 세포와 또한 조합될 수 있다.
- [0182] 한 실시양태에서, 태반 줄기 세포의 단리된 집단은 다수의 조혈 줄기 세포와 조합된다. 이같은 조혈 줄기 세포는, 예를 들어, 미처리 태반혈, 제대혈 또는 말초혈; 태반혈, 제대혈 또는 말초혈로부터의 전체 유핵 세포; 태반혈, 제대혈 또는 말초혈로부터의 CD34⁺ 세포의 단리된 집단; 미처리 골수; 골수로부터의 전체 유핵 세포; 골수로부터의 CD34⁺ 세포의 단리된 집단 등 내에 함유될 수 있다.
- [0183] **5.4 태반 줄기 세포 은행의 생산**
- [0184] 산후 태반으로부터의 줄기 세포를 다수의 상이한 방식으로 배양하여, 태반 줄기 세포의 로트(lot)의 셋트, 예를 들어, 개별적으로 투여가능한 용량들의 셋트를 생산할 수 있다. 이같은 로트는, 예를 들어, 태반 관류액 또는 효소-소화된 태반 조직으로부터의 줄기 세포로부터 수득할 수 있다. 다수의 태반으로부터 수득된, 태반 줄기 세포의 로트의 셋트는, 예를 들어, 장기 보관을 위해 태반 줄기 세포의 은행에 배열될 수 있다. 일반적으로, 부작성 줄기세포가 태반 재료의 초기 배양물로부터 수득되어 종자 배양물을 형성하고, 이는 제어된 조건 하에 확장되어 대략 동등한 배가수의 세포의 집단을 형성한다. 로트는 바람직하게는 단일 태반의 조직으로부터 유래되지만, 다수의 태반의 조직으로부터 유래될 수 있다.
- [0185] 한 실시양태에서, 줄기 세포 로트가 하기와 같이 수득된다. 먼저 태반 조직을, 예를 들어, 다져서, 파괴하고, 적절한 효소, 예를 들어, 콜라게나제로 소화시킨다 (상기 섹션 5.2.3 참조). 바람직하게는 태반 조직은, 예를 들어, 단일 태반으로부터의 전체 양막, 전체 융모막, 또는 양쪽 모두를 포함하지만, 양막 또는 융모막 중 하나의 일부분만을 포함할 수 있다. 소화된 조직을, 예를 들어, 약 1-3주, 바람직하게는 약 2주 동안 배양한다. 비-부작성 세포의 제거 후, 형성된 고밀도 콜로니를, 예를 들어, 트립신처리에 의해, 수집한다. 이러한 세포들을 수집하고 편리한 부피의 배양 배지에 재현탁시키고, 계대 0 세포로 정의한다.
- [0186] 그후 계대 0 세포를 사용하여 확장 배양물에 파종한다. 확장 배양물은 개별적인 세포 배양 장치들, 예를 들어, 셀 팩토리(Cell Factory) (NUNCTM)의 임의의 배열일 수 있다. 계대 0 배양물 내의 세포들은 확장 배양물에 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 , 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 10×10^4 개의 줄기세포가 파종되도록 임의의 정도로 세분될 수 있다. 바람직하게는, 약 2×10^4 개 내지 약 3×10^4 개의 계대 0 세포가 각각의 확장 배양물에 파종하는데 사용된다. 확장 배양물의 수는 계대 0 세포의 수에 좌우될 수 있고, 줄기 세포가 수득된 특정 태반(들)에 따라 수가 더 크거나 작을 수 있다.
- [0187] 배양물 내의 세포의 밀도가 특정 값, 예를 들어, 약 1×10^5 개의 세포/cm²에 이를 때까지 확장 배양물이 성장된다. 세포는 이러한 지점에서 수집 및 냉동보존될 수 있거나, 또는 상기 기술된 바와 같이 새로운 확장 배양물 내로 계대될 수 있다. 세포는 사용 전에, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20회 계대될 수 있다. 바람직하게는 개체수 배가의 누적 횟수의 기록이 확장 배양(들) 동안 유지된다. 계대 0 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 집단을 개

별적인 용량으로 나누기 전의 개체수 배가 횟수는 약 15 내지 약 30회, 바람직하게는 약 20회이다. 세포는 확장 프로세스 전반에 걸쳐 연속적으로 배양될 수 있거나, 또는 확장 동안 1회 이상 냉동될 수 있다.

[0188] 개별적인 용량에 사용될 세포가 추후의 사용을 위해 동결, 예를 들어, 냉동보존될 수 있다. 개별적인 용량은, 예를 들어, 약 1백만 내지 약 1억개의 세포/ml를 포함할 수 있고, 전체적으로는 약 10^6 내지 10^9 개의 세포를 포함할 수 있다.

[0189] 이러한 방법의 특정 실시양태에서, 계대 0 세포가 제1 배가수, 예를 들어 약 4회 배양된 후, 제1 세포 은행에서 동결된다. 제1 은행으로부터의 세포가 동결되어 제2 세포 은행에 파종하는데 사용되고, 제2 세포 은행의 세포는 제2 배가수, 예를 들어, 또다른 약 8회 배가로 확장된다. 이러한 단계의 세포가 수집 및 동결되어, 새로운 배양물에 파종하는데 사용되고, 이러한 배양물은 제3 배가수, 예를 들어 추가적인 약 8회 배가로 진행되도록 허용되어, 누적 세포 배가 횟수가 약 20이 된다. 계대 중 중간 지점의 세포는 후속 확장 배양에서 사용하기 위해 약 100,000 내지 약 1천만 개의 세포/ml, 바람직하게는 약 1백만 개의 세포/ml의 유닛으로 동결될 수 있다. 약 20회 배가된 세포가 약 1백만 내지 약 1억개의 세포/ml 사이의 개별적인 용량으로 투여 또는 줄기-세포 함유 조성물의 제조에서의 사용을 위해 동결될 수 있다.

[0190] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 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 냉동보존하는 단계를 포함하고, 이때 상기 개별적인 용량들이 총괄적으로 태반 줄기 세포 은행을 구성하는, 태반 줄기 세포 은행의 제조 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 전체 개체수 배가 횟수는 약 20이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 다수의 제1 개체수 배가는 약 4회의 개체수 배가이고; 상기 다수의 제2 개체수 배가는 약 8회의 개체수 배가이며; 상기 다수의 제3 개체수 배가는 약 8회의 개체수 배가이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 1차 배양 태반 줄기 세포는 태반 관류액으로부터의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 1차 배양 태반 줄기 세포는 소화된 태반 조직으로부터의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 1차 배양 태반 줄기 세포는 태반 관류액 및 소화된 태반 조직으로부터의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포 1차 배양물 내의 모든 상기 태반 줄기 세포는 동일한 태반으로부터의 것이다. 또다른 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 상기 작업용 세포 은행으로부터의 상기 다수의 태반 줄기 세포로부터 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺ 태반 줄기 세포를 선별하여 개별적인 용량을 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^4 내지 약 10^5 개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^5 내지 약 10^6 개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^6 내지 약 10^7 개의 태반 줄기 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10^7 내지 약 10^8 개의 태반 줄기 세포를 포함한다.

[0191] 바람직한 실시양태에서, 태반이 수득되는 기증자 (예를 들어, 어머니)가 1가지 이상의 병원체에 대해 테스트된다. 테스트된 병원체에 대해 어머니가 양성이면, 태반으로부터의 전체 로트가 폐기된다. 이같은 테스트는 계대 0 세포의 수립 전 또는 후, 또는 확장 배양 동안에 포함하여 태반 줄기 세포 로트 생산 동안의 임의의 시점에 수행될 수 있다. 존재에 대해 테스트되는 병원체에는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, 인간 면역결핍 바이러스 (I형 및 II형), 사이토메갈로바이러스, 헤르페스바이러스 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0192] 5.5 태반 줄기 세포의 분화

[0193] 5.5.1 뉴런성 또는 신경발생성 세포로의 분화의 유도

[0194] 태반 줄기 세포의 뉴런성 분화는, 예를 들어, 태반 줄기 세포를 뉴런으로의 분화를 유도하는 세포 배양 조건에 놓음으로써 달성될 수 있다. 예시적인 방법에서, 신경발생성 배지는 DMEM/20% FBS 및 1 mM 베타-메르캅토에탄올을 포함한다; 이같은 배지는 약 24시간 동안의 배양 후 DMEM 및 1-10 mM 베타메르캅토에탄올로 구성된 배지로 대체될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 세포가 DMEM/2% DMSO/200 μ M 부틸화 히드록시아니솔과 접촉된다. 특정 실시양태에서, 분화 배지는 무혈청 DMEMIF-12, 부틸화 히드록시아니솔, 염화칼륨, 인슐린, 포르스콜린, 발프

로산, 및 히드로코르티손을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 뉴런성 분화는 태반 줄기 세포를 라미닌이 코팅된 플레이트 상에서 B27 보충물 및 L-글루타민을 함유하고 임의로 bFGF 및/또는 EGF가 보충된 Neurobasal-A 배지 (Invitrogen, Carlsbad CA) 내에 플레이트함으로써 달성된다. 또한 태반 줄기 세포는 신경 세포와의 공동-배양 또는 뉴런-컨디셔닝 배지에서의 배양에 의해 신경 분화로 유도될 수 있다.

[0195] 뉴런성 분화는, 예를 들어, 뉴런-유사 형태학 (예를 들어, 확장된 돌기를 포함하는 양극 세포)의 검출; RT-PCR에 의한 예를 들어 신경 성장 인자 수용체 및 신경미세섬유 중쇄 유전자의 발현의 검출; 또는 전기 활성의 예를 들어 패치-클램프(patch-clamp)에 의한 검출에 의해 평가될 수 있다. 태반 줄기 세포는 세포가 1가지 이상의 이러한 특성을 디스플레이하는 경우 뉴런 세포로 분화한 것으로 간주된다.

[0196] 5.5.2 지방발생성 세포로의 분화의 유도

[0197] 태반 줄기 세포의 지방발생성 분화는, 예를 들어, 태반 줄기 세포를 지방세포로의 분화를 유도하는 세포 배양 조건에 놓음으로써 달성될 수 있다. 바람직한 지방발생성 배지는 15% 제대혈 혈청이 보충된 DMEM 또는 MSCGM (Cambrex)을 포함한다. 한 실시양태에서, 태반 줄기 세포를 지방발생 유도 배지(Adipogenesis Induction Medium) (Cambrex)에 공급하고, 3일 (37°C, 5% CO₂) 동안 배양한 후, 지방발생 유지 배지(Adipogenesis Maintenance Medium) (Cambrex)에서 1-3일 동안 배양한다. 유도/유지의 3회의 완전한 사이클 후, 세포를 추가로 7일 동안 지방발생 유지 배지에서 배지를 2-3일마다 교체하면서 배양한다.

[0198] 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포가 1 μ M 텍사메타손, 0.2 mM 인도메타신, 0.01 mg/ml 인슐린, 0.5 mM IBMX, DMEM-고 글루코스, FBS, 및 항생제를 포함하는 배지에서 배양된다. 1가지 이상의 글루코코르티코이드 (예를 들어, 텍사메타손, 인도메타손, 히드로코르티손, 코르티손), 인슐린, cAMP (예를 들어, 디부티릴-cAMP; 8-CPT-cAMP (8-(4)클로로페닐티오)-아데노신, 3',5' 고리형 모노포스페이트); 8-브로모-cAMP; 디옥타노일-cAMP; 포르스콜린)의 세포내 수준을 상승시키는 화합물 및/또는 cAMP의 분해를 억제하는 화합물 (예를 들어, 포스포디에스테라제 억제제 예컨대 이소부틸메틸잔틴 (IBMX), 메틸 이소부틸잔틴, 테오필린, 카페인, 인도메타신)을 포함하는 배지에서의 배양에 의해 태반 줄기 세포가 또한 지방발생을 향해 유도될 수 있다.

[0199] 지방발생의 보증서는 친지성 염색 오일 레드 O를 사용하여 쉽게 관찰할 수 있는 다수의 세포질내 지질 소포의 발생이다. 지방세포로 분화하기 시작한 태반 줄기 세포에서 리파제 및/또는 지방산 결합 단백질 유전자의 발현이 RT/PCR에 의해 확인된다. 태반 줄기 세포는 세포가 1가지 이상의 이러한 특성을 디스플레이하는 경우 지방 세포성 세포로 분화한 것으로 간주된다.

[0200] 5.5.3 연골세포성 세포로의 분화의 유도

[0201] 태반 줄기 세포의 연골발생성 분화는, 예를 들어, 연골세포로의 분화를 유도하는 세포 배양 조건에 태반 줄기 세포를 놓음으로써 달성될 수 있다. 바람직한 연골세포성 배지는 15% 제대혈 혈청이 보충된 DMEM 또는 MSCGM (Cambrex)을 포함한다. 한 실시양태에서, 태반 줄기 세포가 무균성 폴리프로필렌 튜브 내로 분취되고, 원심분리되고 (예를 들어, 150×g에서 5분), 불완전 연골발생 배지(Incomplete Chondrogenesis Medium) (Cambrex)에서 2회 세정된다. 세포가 약 $1-20 \times 10^5$ 개의 세포/ml의 농도로 0.01 μ g/ml TGF-베타-3를 포함하는 완전 연골발생 배지(Complete Chondrogenesis Medium) (Cambrex)에 재현탁된다. 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는, 아스코르베이트와 함께 또는 아스코르베이트 없이, 외인성 성장 인자, 예를 들어, GDF-5 또는 전환 성장 인자 베타3 (TGF-베타3)와 접촉된다. 연골발생성 배지에 프롤린 및 글루타민이 포함되는 아미노산, 피루브산나트륨, 텍사메타손, 아스코르브산, 및 인슐린/트랜스페린/셀레늄이 보충될 수 있다. 연골발생성 배지에 수산화나트륨 및/또는 콜라겐이 보충될 수 있다. 태반 줄기 세포는 고밀도 또는 저밀도에서 배양될 수 있다. 세포는 바람직하게는 혈청의 부재 하에 배양된다.

[0202] 연골발생은, 예를 들어, 호산성 기저물질의 생산의 관찰, 글리코스아미노글리칸 발현에 대한 사프라닌-O 염색; 헤마톡실린/에오신 염색, 세포 형태학의 평가, 및/또는 콜라겐 2 및 콜라겐 9 유전자 발현의 RT/PCR 확인에 의해 평가될 수 있다. 또한 연골발생은 줄기 세포를 현탁액에서 부드럽게 원심분리함 (예를 들어, 약 800g에서 약 5분)으로써 예를 들어 형성된 펠렛에서 줄기 세포를 성장시킴으로써 또한 관찰될 수 있다. 약 1-28일 후, 줄기 세포의 펠렛이 단단한 매트릭스를 형성하기 시작하고, 유도되지 않은 또는 연골발생성이 아닌 세포주 (이의 펠렛은 켈린지되는 경우 흐트러지는 경향이 있음)에서는 발견되지 않는 구조적 통합성을 나타낸다. 또한 연골발생은, 예를 들어, 이같은 세포 펠렛에서, 콜라겐을 염색하는 염색제, 예를 들어, 시리우스 레드(Sirius Red), 및/또는 글리코스아미노글리칸 (GAG)을 염색하는 염색제, 예를 들어, 알시안 블루(Alcian Blue)로 염색함으로써 또한 증명될 수 있다. 태반 줄기 세포는 1가지 이상의 이러한 특성을 디스플레이하는 경우 연골세포성

세포로 분화된 것으로 간주된다.

[0203] 5.5.4 골세포성 세포로의 분화의 유도

[0204] 태반 줄기 세포의 골발생 분화는, 예를 들어, 태반 줄기 세포를 골세포로의 분화를 유도하는 세포 배양 배지에 놓음으로써 달성될 수 있다. 바람직한 골세포성 배지는 15% 제대혈 혈청이 보충된 DMEM 또는 MSCGM (Cambrex)에 이어서, 0.1 μ M 텍사메타손, 0.05 mM 아스코르브산-2-포스페이트, 10 mM 베타 글리세로포스페이트를 함유하는 골발생 유도 배지(Osteogenic Induction Medium)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 약 10^{-7} 내지 약 10^{-9} M 텍사메타손, 약 10-50 μ M 아스코르베이트 포스페이트 염 (예를 들어, 아스코르베이트-2-포스페이트) 및 약 10 nM 내지 약 10 mM β -글리세로포스페이트를 함유하는 배지 (예를 들어, DMEM-저 글루코스)에서 배양된다. 골발생 배지는 혈청, 1가지 이상의 항생제/항진균제, 전환 성장 인자-베타 (예를 들어, TGF- β 1) 및/또는 골 형태발생 단백질 (예를 들어, BMP-2, BMP-4, 또는 이의 조합물)을 또한 포함할 수 있다.

[0205] 분화는 칼슘-특이적 염색제, 예를 들어, 본 코사(von Kossa) 염색, 및 예를 들어, 알칼리성 포스파타제, 오스테오칼신, 골 사이알로단백질(sialoprotein) 및/또는 오스테오키프틴 유전자 발현의 RT/PCR 검출을 사용하여 평가할 수 있다. 태반 줄기 세포는 1가지 이상의 이러한 특성을 디스플레이하는 경우 골세포성 세포로 분화된 것으로 간주된다.

[0206] 5.5.5 췌장 세포로의 분화의 유도

[0207] 인슐린-생산 췌장 세포로의 태반 줄기 세포의 분화는, 예를 들어, 태반 줄기 세포를 췌장 세포로의 분화를 유도하는 세포 배양 배지에 놓음으로써 달성될 수 있다.

[0208] 예시적인 췌장발생 배지는 염기성 섬유모세포 성장 인자 (10 ng/ml); 및 전환 성장 인자 베타-1 (2 ng/ml)이 보충된 DMEM/20% CBS를 포함한다. 이러한 배지는 네스틴-양성 뉴런성 세포 배양물로부터의 조건화 배지와 50/50 v/v로 조합된다. 녹아웃(knockOut) 혈청 대체물이 CBS 대신 사용될 수 있다. 3-4일마다 재공급하면서 세포를 14-28일 동안 배양한다.

[0209] 인슐린 단백질 생산 또는 RT/PCR에 의한 인슐린 유전자 발현을 예를 들어 평가함으로써 분화를 확인할 수 있다. 태반 줄기 세포는 1가지 이상의 이러한 특성을 디스플레이하는 경우 췌장 세포로 분화된 것으로 간주된다.

[0210] 5.5.6 심장 세포로의 분화의 유도

[0211] 태반 줄기 세포의 근원성 (심장발생) 분화는, 예를 들어, 태반 줄기 세포를 심근세포로의 분화를 유도하는 세포 배양 조건에 놓음으로써 달성될 수 있다. 바람직한 심근세포성 배지는 레티노산 (1 μ M); 염기성 섬유모세포 성장 인자 (10 ng/ml); 및 전환 성장 인자 베타-1 (2 ng/ml); 및 표피 성장 인자 (100 ng/ml)가 보충된 DMEM/20% CBS를 포함한다. 녹아웃 혈청 대체물 (Invitrogen, Carlsbad, California)이 CBS 대신 사용될 수 있다. 별법적으로, 50 ng/ml 카디오토프린(Cardiotropin)-1이 보충된 DMEM/20% CBS에서 24시간 동안 태반 줄기 세포가 배양된다. 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포가 5-7일 동안 단백질이 없는 배지에서, 이어서 인간 심근층을 1% 제대혈 혈청이 보충된 1% HEPES 완충제에서 균질화시킴으로써 예를 들어 생산된 인간 심근층 추출물로 자극되어, 10-14일 배양될 수 있다.

[0212] 분화는 심장 액틴 유전자 발현의 증명 (예를 들어, RT/PCR에 의해)에 의해, 또는 세포의 눈에 보이는 박동에 의해 확인될 수 있다. 태반 줄기 세포는 1가지 이상의 이러한 특성을 디스플레이하는 경우 심장 세포로 분화된 것으로 간주된다.

[0213] 5.6 태반 줄기 세포의 보존

[0214] 태반 줄기 세포는 보존될 수 있고, 즉 장기 보관을 허용하는 조건, 또는 예를 들어 세포자멸사 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 놓일 수 있다.

[0215] 태반 줄기 세포를, 예를 들어, 발명의 영문 명칭이 "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs"인 관련된 미국 특허 가출원 번호 60/754,969 (2005년 12월 25일 출원)에 기술된 바와 같은, 세포자멸사 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 조성물을 사용하여 보존할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 줄기 세포의 집단을 세포자멸사 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 줄기 세포 수집 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 세포자멸사 억제제는 세포자멸사 억제제와 접촉되지 않은 줄기 세포의 집단과 비교하여, 이러한 줄기 세포 집단에서 세포자멸사를 감소시키거나

방지하는데 충분한 양으로, 그리고 이에 충분한 시간 동안 존재하는, 줄기 세포의 집단을 보존하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 세포자멸사 억제제는 카스파제 억제제이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 세포자멸사 억제제는 JNK 억제제이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 JNK 억제제는 상기 줄기 세포의 분화 또는 증식을 조정하지 않는다. 또다른 실시양태에서, 상기 줄기 세포 수집 조성물은 별도의 상 내의 상기 세포자멸사 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 상기 줄기 세포 수집 조성물은 유화액 내의 상기 세포자멸사 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 줄기 세포 수집 조성물은 유화제, 예를 들어, 레시틴을 추가로 포함한다. 또다른 실시양태에서, 상기 세포자멸사 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 줄기 세포에 접촉하는 시점에 약 0℃ 내지 약 25℃ 사이이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 세포자멸사 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 줄기 세포에 접촉하는 시점에 약 2℃ 내지 10℃ 사이, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃ 사이이다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 줄기 세포 집단의 운반 도중에 수행된다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 줄기 세포 집단의 동결 및 해동 동안 수행된다.

[0216] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 태반 줄기 세포의 집단을 세포자멸사 억제제 및 장기-보존 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 세포자멸사 억제제는 세포자멸사 억제제와 접촉되지 않은 줄기 세포의 집단과 비교하여, 이러한 줄기 세포 집단에서 세포자멸사를 감소시키거나 방지하는데 충분한 양으로, 그리고 이에 충분한 시간 동안 존재하는, 태반 줄기 세포의 집단을 보존하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 장기-보존 화합물은 UW 용액 (미국 특허 번호 4,798,824에 기술됨; ViaSpan으로 또한 공지됨; [Southard et al., Transplantation 49(2):251-257 (1990)]를 또한 참조) 또는 미국 특허 번호 5,552,267 (Stern 등)에 기술된 용액이다. 또다른 실시양태에서, 상기 장기-보존 화합물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, 또는 이들의 조합물이다. 또다른 실시양태에서, 줄기 세포 수집 조성물은 산소-운반 퍼플루오로카본을 2-상 내에 또는 유화액으로서 추가적으로 포함한다.

[0217] 이러한 방법의 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는, 관류 동안, 세포자멸사 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 줄기 세포 수집 조성물, 장기-보존 화합물, 또는 이들의 조합물과 접촉된다. 또다른 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조직 파괴 프로세스, 예를 들어, 효소성 소화 동안 접촉된다. 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 관류에 의한 수집 후에, 또는 조직 파괴, 예를 들어, 효소성 소화에 의한 수집 후에 상기 줄기 세포 수집 화합물과 접촉된다.

[0218] 전형적으로, 태반 세포 수집, 강화 및 단리 동안, 저산소증 및 기계적 스트레스로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 이러한 방법의 또다른 실시양태에서, 줄기 세포, 또는 줄기 세포 집단이 상기 보존 동안 6시간 미만으로 수집, 강화 또는 단리 동안의 저산소성 조건에 노출되고, 이때 저산소성 조건은 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소의 농도이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포 집단은 상기 보존 동안 2시간 미만 동안 상기 저산소성 조건에 노출된다. 또다른 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 줄기 세포 집단은, 수집, 강화 또는 단리 동안, 상기 저산소성 조건에 1시간 미만 또는 30분 미만 동안 노출되거나, 또는 저산소성 조건에 노출되지 않는다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 줄기 세포 집단은 수집, 강화 또는 단리 동안 전단 스트레스에 노출되지 않는다.

[0219] 본 발명의 태반 줄기 세포는 냉동보존될 수 있고, 예를 들어, 소형 컨테이너, 예를 들어, 앰플 내의 냉동보존 배지에 냉동보존될 수 있다. 적절한 냉동보존 배지에는 성장 배지가 예를 들어 포함되는 배양 배지, 또는 세포 동결 배지, 예를 들어 시판되는 세포 동결 배지, 예를 들어, C2695, C2639 또는 C6039 (Sigma)가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 냉동보존 배지는 바람직하게는 DMSO (디메틸설폭사이드)를, 예를 들어, 약 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 냉동보존 배지는 추가적인 작용제, 예를 들어, 메틸셀룰로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 바람직하게는 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 전에 액체 질소로 옮겨질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 일단 앰플이 약 -90℃에 도달하면, 이를 액체 질소 보관 구역으로 옮긴다. 냉동보존은 속도가 제어된 동결기를 사용하여 또한 이루어질 수 있다. 바람직하게는 냉동보존된 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도, 바람직하게는 약 37℃의 온도에서 해동된다.

[0220] 5.7 태반 줄기 세포의 용도

[0221] 5.7.1 태반 줄기 세포 집단

[0222] 태반 줄기 세포 집단은 줄기 세포 집단의 투여를 받을 수 있는 임의의 질환, 장애 또는 용태를 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 "치료"는 질환, 장애 또는 용태, 또는 이의 임의의 파라미터 또는 증상의 치유,

교정, 개선, 중증도 축소 또는 경시적 감소를 포함한다.

- [0223] 태반 줄기 세포, 및 태반 줄기 세포의 집단은 줄기 세포 또는 줄기 세포로부터 분화된 세포를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 제제 내에서, 생체외에서 또는 생체내에서, 특정 세포 유형으로 분화되도록 유도될 수 있다. 예를 들어, 태반 줄기 세포는 손상된 장기 내로, 그리고 생체 내에서의 손상 복구 및 장기 신생을 위해 주사될 수 있다. 이같은 손상은 심근경색증, 발작 장애, 다발성 경화증, 뇌졸중, 저혈압, 심장 정지, 허혈, 염증, 갑상선염, 인지 기능의 연령-관련 손실, 방사선 손상, 뇌성마비, 신경변성 질환, 알츠하이머병, 파킨슨병, 라이(Leigh)병, AIDS, 치매, 기억 손상, 근위축성 측삭 경화증, 근육 퇴행위축, 허혈성 심장병, 뇌 또는 척수 외상, 심장-폐 우회술, 녹내장, 망막 허혈, 또는 망막 외상이 포함되지만, 이에 한정되지 않는 용태 및 장애로 인한 것일 수 있다.
- [0224] 태반 줄기 세포는 자가면역 용태 예컨대 소아 당뇨병, 루푸스, 근육 퇴행위축, 류머티스 관절염 등을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0225] 특정 실시양태에서, 분리된 태반 줄기 세포 집단은 라이소솜성 저장 질환, 예컨대 태이-색스(Tay-Sachs), 니만-픽(Niemann-Pick), 파브리(Fabry), 고셔(Gaucher) 질환 (예를 들어, 글루코세르브로시다제 결핍증), 헌터(Hunter), 및 헐러(Hurler) 증후군, 마로토-라미(Maroteaux-Lamy) 증후군, 푸코시드 축적증 (푸코스다제 결핍증), 바튼(Batten) 질환 (CLN3), 뿐만 아니라 기타 갱글리오사이드 축적증, 점액다당류증, 및 글리코겐증이 포함되지만 이에 한정되지 않는 특정 질환 또는 용태를 치료하기 위한 자가 또는 이종성 효소 대체 요법에서 사용될 수 있다.
- [0226] 분리된 태반 줄기 세포 집단은, 단독으로 또는 줄기 또는 기원 세포 집단과 조합되어, 선천적인 대사 이상, 낭성 섬유증, 부신백질이영양증 (예를 들어, co-A 리가제 결핍증), 이염성 백질이영양증 (아릴술파타제 A 결핍증) (예를 들어, 증후성, 또는 전(前)-증후성 후기 영아성 또는 소아성 형태), 구상 세포 백색이영양증 (크라베(Krabbe) 질환; 갈락토세레브로시다제 결핍증), 산 리파제 결핍증 (울만(Wolman) 질환), 글리코겐 저장 질환, 갑상선저하증, 빈혈 (예를 들어, 재생불량 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈 등), 피어슨(Pearson) 증후군, 폼페(Pompe) 질환, 페닐케톤뇨증 (PKU), 포르피린증, 단풍시럽뇨 질환, 호모시스틴뇨증, 점액다당류증, 만성 육아종 질환 및 티로신혈증 및 태이-색스 질환을 정정하기 위해 또는 암 (예를 들어, 혈액 악성종양), 종양 또는 기타 병리학적 용태를 치료하기 위해, 단독으로 또는 유전자 요법에서의 자가 또는 이종성 트랜스진(transgene) 캐리어로서 사용될 수 있다. 태반 줄기 세포는 골격 형성이상을 치료하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 조직 플라스미노겐 활성화제 (tPA)를 발현하도록 형질전환된 태반 줄기 세포가 혈전을 치료하기 위해 개체에게 투여될 수 있다.
- [0227] 또다른 실시양태에서, 분리된 태반 줄기 세포 집단은 각막 상피 결함의 치료, 불완전 골형성증의 치료, 연골 복구, 안면 박피술, 점막, 고막, 장 내막, 신경학적 구조물 (예를 들어, 망막, 기저막 내의 청각 뉴런, 후각 상피 내의 후각 뉴런), 피부의 외상성 손상에 대한 화상 및 상처 복구가 포함되지만 이에 한정되지 않는 자가 또는 이종성 조직 재생 또는 대체 요법 또는 프로토콜에서, 또는 기타 손상되거나 병에 걸린 장기 또는 조직의 재건을 위해 사용될 수 있다.
- [0228] 바람직한 실시양태에서, 분리된 태반 줄기 세포 집단은 혈액학적 악성종양의 치료와 같은 치료에서, 조혈 줄기 세포의 부분적인 또는 전체적인 손실을 겪은 개체, 예를 들어, 치사량 또는 준-치사량의 방사선 (산업용, 의료용 또는 군사용)에 노출된 개체; 예를 들어 암 요법의 일부로서의 골수제거를 받은 개체 등에서의 조혈 재구성에서 사용된다. 태반 줄기 세포는 빈혈 (예를 들어, 재생불량 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈 등)이 있는 개체에서의 조혈 재구성에서 사용될 수 있다. 바람직하게는, 태반 줄기 세포는 이같은 개체에게 조혈 줄기 세포 집단과 함께 투여된다. 분리된 태반-유래 줄기 세포 집단은 골수 또는 골수로부터 유래된 줄기 세포의 집단 대신에 또는 이를 보충하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 환자 체중 1 kg 당 약 1×10^8 내지 2×10^8 개의 골수 단핵 세포가 골수 이식에서의 생착(engraftment)을 위해 주입된다 (즉, 70 kg의 기증자에 대해 약 70 mL의 골수). 70 mL를 수득하는 것은 기증 프로세스 동안의 집중적인 기증 및 현저한 기증자 혈액의 손실을 필요로 한다. 다양한 실시양태에서, 조혈 재구성을 위한 분리된 태반 줄기 세포 집단은 약, 적어도, 또는 최대 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 또는 그 이상의 태반 줄기 세포를 포함할 수 있다.
- [0229] 따라서, 한 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 혈액암, 예컨대 림프종, 백혈병 (예컨대 만성 또는 급성 골수성 백

혈병, 급성 림프구성 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 질환 등), 척수형성이상증, 척수형성이상 증후군 등이 있는 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 질환, 장애 또는 용태는 만성 육아종 질환이다.

[0230] 조혈 재구성이 빈혈의 치료에서 사용될 수 있기 때문에, 본 발명은 빈혈 또는 혈액 헤모글로빈 장애가 있는 개체의 본 발명의 줄기 세포 조합물로의 치료를 추가로 포함한다. 빈혈 또는 이러한 장애는 천연적일 수 있거나 (예를 들어, 유전학 또는 질환에 의해 야기됨), 또는 인공적으로 유도될 수 있다 (예를 들어, 우연한 또는 의도적인 중독, 화학치료법 등에 의해). 또다른 실시양태에서, 이러한 질환 또는 장애는 골수 기능부진 증후군 (예를 들어, 재생불량 빈혈, 코스트만(Kostmann) 증후군, 다이아몬드-블랙판(Diamond-Blackfan) 빈혈, 무거핵구성 혈소판감소증 등), 골수 장애 또는 조혈 질환 또는 장애일 수 있다.

[0231] 태반 줄기 세포는 복합 면역결핍 질환 (예를 들어, 비스코트-올드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군, 중증 디조지(DiGeorge) 증후군 등)이 포함되지만 이에 한정되지 않는 중증 복합 면역결핍 질환을 치료하는데 또한 사용될 수 있다.

[0232] 본 발명의 태반 줄기 세포는, 단독으로 또는 다른 줄기 세포 또는 기원 세포 집단과 조합되어, 생체 내에서의 조직 또는 장기의 제작에 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 태반으로부터 수득된 세포, 예를 들어, 줄기 세포 또는 기원 세포를 사용하여, 매트릭스에 파종하고, 세포가 분화되고 매트릭스에 거주하도록 하는 적합한 조건 하에 배양하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법에 의해 수득된 조직 및 장기는 연구 및 치료 목적을 포함하는 다양한 목적에 사용될 수 있다.

[0233] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 태반 줄기 세포 및 태반 줄기 세포 집단은 조화(matched) 및 부조화(mismatched) HLA 유형 조혈 이식편을 포함하는 자가 및 동종 이식편에 사용될 수 있다. 동종 조혈 이식편으로서의 태반 줄기 세포의 용도의 한 실시양태에서, 숙주는 기증자 세포의 면역학적 거부를 감소시키도록 또는 면역내성이 생성되도록 치료된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,800,539 및 5,806,529 참조). 또다른 실시양태에서, 숙주는 면역학적 거부를 감소시키도록 또는 면역내성이 생성되도록 치료되지 않는다.

[0234] 태반 줄기 세포는, 단독으로 또는 1가지 이상의 다른 줄기 세포 집단과 조합되어, 치료용 이식 프로토콜에서, 예를 들어, 간, 췌장, 신장, 폐, 신경계, 근육계, 골, 골수, 흉선, 지라, 점막 조직, 생식샘, 또는 모발의 줄기 또는 기원 세포를 증대시키거나 대체하기 위해 사용될 수 있다. 추가적으로, 태반 줄기 세포는 기원 세포가 전형적으로 사용될 치료용 또는 연구 프로토콜에서 특정 클래스의 기원 세포 (예를 들어, 연골세포, 간세포, 조혈 세포, 췌장 실질 세포, 신경모세포, 근육 기원 세포 등) 대신 사용될 수 있다.

[0235] 한 실시양태에서, 본 발명은 모발 대체 요법에 대한 보조약으로서의 태반 줄기 세포, 특히 CD200⁺ 태반 줄기 세포의 용도를 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 태반 줄기 세포, 예를 들어, CD200⁺ 태반 줄기 세포가 모발 성장 또는 재성장이 요망되는 부위에 피하 또는 피내 주사된다. 주사된 줄기 세포의 수는, 예를 들어, 약 0.1 내지 약 1.0 μ l 부피로 주사 당 약 100개 내지 약 10,000개일 수 있지만, 더 크거나 더 적은 부피 내의 더 많거나 더 적은 세포가 또한 사용될 수 있다. 모발 재성장을 용이하게 하기 위한 태반 줄기 세포의 투여는 모발 재성장이 요망되는 영역에서의 단일 주사 또는 다중 주사 (예를 들어, 규칙적 또는 무작위 패턴)를 포함할 수 있다. 공지된 모발 재성장 요법, 예를 들어, 국소 미녹시딜이 태반 줄기 세포와 함께 사용될 수 있다. 태반 줄기 세포를 사용하여 치료될 수 있는 모발 손실은 천연-발생 손실이거나 (예를 들어, 남성 패턴의 탈모증), 또는 유도될 수 있다 (예를 들어, 독성 화학 노출로부터 초래됨).

[0236] 본 발명의 태반 줄기 세포 및 태반 줄기 세포 집단은 연골, 힘줄 또는 인대의 증대, 복구 또는 대체에 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 보철물 (예를 들어, 엉덩이 보철물)이 본 발명의 태반 줄기 세포로부터 성장된 대체 연골 조직 구축물로 코팅될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 관절 (예를 들어, 무릎)이 태반 줄기 세포로부터 성장된 연골 조직 구축물로 재건될 수 있다. 연골 조직 구축물은 여러 유형의 관절에 대한 주요 재건 수술에서 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, [Resnick & Niwayama, eds., 1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2d ed., W. B. Saunders Co.] 참조).

[0237] 본 발명의 태반 줄기 세포는 외상, 대사 장애 또는 질환으로부터 예를 들어 초래된 조직 및 장기에 대한 손상을 복구하는데 사용될 수 있다. 외상은, 예를 들어, 수술, 예를 들어, 미용 수술로부터의 외상일 수 있다. 이같은 실시양태에서, 질환의 결과로서 손상된 조직 또는 장기를 재생 또는 복원시키기 위해 환자에게 태반 줄기 세포가 단독으로 또는 다른 줄기 또는 기원 세포 집단과 조합되어 투여될 수 있다.

[0238] 5.7.2 태반 줄기 세포를 포함하는 조성물

- [0239] 본 발명은 태반 줄기 세포 또는 이로부터의 생체분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 태반 줄기 세포는 연구 또는 치료학에서 예를 들어 사용하기 위한 임의의 생리학적으로 허용가능한 또는 의학적으로 허용가능한 화합물, 조성물 또는 장치와 조합될 수 있다.
- [0240] 5.7.2.1 냉동보존된 태반 줄기 세포
- [0241] 본 발명의 태반 줄기 세포 집단은 추후의 사용을 위해 보존될 수 있고, 예를 들어, 냉동보존될 수 있다. 세포, 예컨대 줄기 세포의 냉동보존 방법은 당업계에 주지되어 있다. 태반 줄기 세포 집단은 개체에게 용이하게 투여가능한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 의학적 사용에 적절한 컨테이너 내에 함유된 태반 줄기 세포 집단을 제공한다. 이같은 컨테이너는, 예를 들어, 무균성 플라스틱 백, 플라스크, 병, 또는 태반 줄기 세포 집단이 용이하게 분배될 수 있는 기타 컨테이너일 수 있다. 예를 들어, 컨테이너는 혈액 백, 또는 수용자에게 액체를 정맥내 투여하는데 적절한 기타 의학적으로 허용가능한 플라스틱 백일 수 있다. 바람직하게는 컨테이너는 조합된 줄기 세포 집단의 냉동보존을 허용하는 것이다.
- [0242] 냉동보존된 태반 줄기 세포 집단은 단일 기증자 또는 다수의 기증자로부터 유래된 태반 줄기 세포를 포함할 수 있다. 태반 줄기 세포 집단은 의도된 수용자에 대해 완전 HLA-조화성이거나, 또는 부분적 또는 완전 HLA-부조화성일 수 있다.
- [0243] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 컨테이너 내의 태반 줄기 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포 집단은 냉동보존된다. 또다른 특정 실시양태에서, 컨테이너는 백, 플라스크, 또는 병이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 백은 무균성 플라스틱 백이다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 백은 상기 태반 줄기 세포 집단의 정맥내 투여에 적절하거나, 이를 허용하거나, 또는 이를 용이하게 한다. 백은 태반 줄기 세포와 1가지 이상의 용액, 예를 들어, 약물이 투여전 또는 투여 동안 혼합되는 것을 허용하도록 서로 연결된 다중 공간(lumen) 또는 구획을 포함할 수 있다. 또다른 특정 실시양태에서, 조성물은 조합된 줄기 세포 집단의 냉동보존을 용이하게 하는 1가지 이상의 화합물을 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포 집단은 생리학적으로 허용가능한 수성 용액 내에 함유된다. 더욱 특정한 실시양태에서, 상기 생리학적으로 허용가능한 수성 용액은 0.9% NaCl 용액이다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포 집단은 상기 줄기 세포 집단의 수용자에 대해 HLA-조화성인 태반 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 조합된 줄기 세포 집단은 상기 줄기 세포 집단의 수용자에 대해 적어도 부분적으로 HLA-부조화성인 태반 세포를 포함한다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 다수의 기증자로부터 유래된다.
- [0244] 5.7.2.2 제약 조성물
- [0245] 태반 줄기 세포의 집단, 또는 태반 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단이 생체내에서 사용하기 위한 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 이같은 제약 조성물은 제약상 허용가능한 담체, 예를 들어, 염수 용액 또는 생체내 투여를 위한 기타 허용되는 생리학적으로 허용가능한 용액 내에 태반 줄기 세포의 집단, 또는 태반 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단을 포함한다. 본 발명의 제약 조성물은 본원에 기술된 태반 줄기 세포 집단, 또는 태반 줄기 세포 유형 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 제약 조성물은 태아 태반 줄기 세포, 모체 태반 줄기 세포, 또는 태아 및 모체 양쪽 모두의 태반 줄기 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 단일 개체 또는 태반으로부터 또는 다수의 개체 또는 태반으로부터 수득된 태반 줄기 세포를 추가로 포함할 수 있다.
- [0246] 본 발명의 제약 조성물은 임의의 갯수의 태반 줄기 세포를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 예를 들어, 태반 줄기 세포의 단일 단위 용량은 약, 적어도 또는 최대 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 또는 그 이상의 태반 줄기 세포를 포함할 수 있다.
- [0247] 본 발명의 제약 조성물은 50% 이상의 생육성 세포를 포함하는 세포의 집단을 포함한다 (즉, 집단 내의 세포의 50% 이상이 기능성이거나 살아 있다). 바람직하게는, 집단 내의 세포의 60% 이상이 생육성이다. 더욱 바람직하게는, 제약 조성물 내의 집단 내의 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%가 생육성이다.
- [0248] 본 발명의 제약 조성물은 1가지 이상의 화합물, 예를 들어, 생착을 용이하게 하는 화합물 (예를 들어, 항-T-세포 수용체 항체, 면역억제제 등); 안정화제 예컨대 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 히드록시에틸 전분 등을 포함할 수 있다.
- [0249] 주사용 용액으로 제제화되는 경우, 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 약 1.25% HSA 및 약 2.5% 텍스

트란을 포함한다. 세포 생성물의 투여에 적절한 또다른 주사용 제형이 사용될 수 있다.

[0250] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 기원이 실질적으로 또는 완전히 비-모체인 태반 줄기 세포를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서 본 발명은 $CD200^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이거나; $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, 및 $CD200^{+}$ 이거나; $CD200^{+}$ 및 $OCT-4^{+}$ 이거나; $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이거나; $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이고, 태반 줄기 세포의 집단을 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 태반 세포의 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 $OCT-4^{+}$ 이고, 태반 줄기 세포의 집단을 포함하는 태반 세포의 집단이 배양체-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 태반 세포의 집단에서 1개 이상의 배양체-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 상기의 조합물인 태반 줄기 세포의 집단을 포함하고, 이때 상기 태반 줄기 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 기원이 비-모체인 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 태반으로부터 수득되지 않은 줄기 세포를 추가적으로 포함한다.

[0251] 5.7.2.3 태반 줄기 세포 조건화 배지

[0252] 본 발명의 태반 줄기 세포는 조건화 배지, 즉 줄기 세포로부터 분비 또는 배출된 1가지 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생산하는데 사용될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 조건화 배지는 태반 줄기 세포가 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일 또는 그 이상 동안 성장된 배지를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 조건화 배지는 태반 줄기 세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 전면성장, 또는 100%까지의 전면성장으로 성장된 배지를 포함한다. 이같은 조건화 배지는 별도의 태반 줄기 세포 집단, 또는 또다른 종류의 줄기 세포의 배양을 지지하는데 사용될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 조건화 배지는 태반 줄기 세포가 성체 세포 유형으로 분화된 배지를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 조건화 배지는 태반 줄기 세포 및 비-태반 줄기 세포가 배양된 배지를 포함한다.

[0253] 5.7.2.4 태반 줄기 세포를 포함하는 매트릭스

[0254] 본 발명은 태반 줄기 세포, 또는 태반 줄기 세포 집단을 포함하는 매트릭스, 히드로젤, 스캐폴드 등을 추가로 포함한다.

[0255] 본 발명의 태반 줄기 세포가 천연 매트릭스, 예를 들어, 태반 생체재료 예컨대 양막 재료 상에 파종될 수 있다. 이같은 양막 재료는, 예를 들어, 포유류 태반으로부터 직접 절개된 양막; 고정 또는 열-처리된 양막, 실질적으로 건조한 (즉, <20% H_2O) 양막, 용모막, 실질적으로 건조한 용모막, 실질적으로 건조한 양막 및 용모막 등일 수 있다. 태반 줄기 세포가 파종될 수 있는 바람직한 태반 생체재료가 미국 출원 공보 번호 2004/0048796 (Hariri)에 기술되어 있다.

[0256] 본 발명의 태반 줄기 세포는 주사에 예를 들어 적절한 히드로젤 용액에 현탁될 수 있다. 이같은 조성물에 적절한 히드로젤에는 자가-어셈블링 펩티드, 예컨대 RAD16이 포함된다. 한 실시양태에서, 세포를 포함하는 히드로젤 용액이, 예를 들어 주형 내에서, 세포가 내부에 분산되어 있는 이식용 매트릭스를 형성하도록 경화될 수 있다. 이같은 매트릭스 내의 태반 줄기 세포는 이식 전에 세포가 유사분열적으로 확장되도록 또한 배양될 수 있다. 히드로젤은, 예를 들어, 물 분자를 포획하는 3차원 개방형-격자 구조를 생성하도록 공유 결합, 이온 결합 또는 수소 결합을 통해 가교되어 젤을 형성하는 유기 중합체 (천연 또는 합성)이다. 히드로젤-형성 재료에는 다당류 예컨대 알기네이트 및 이의 염, 펩티드, 폴리포스파진, 및 폴리아크릴레이트 (이온성으로 가교됨), 또는 블록 중합체 예컨대 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 (온도 또는 pH에 의해 가교됨)가 각각 포함된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 히드로젤 또는 매트릭스는 생분해성이다.

[0257] 본 발명의 일부 실시양태에서, 제형은 원위치 중합성 젤을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2002/0022676; [Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3): 199-209 (2002)]; [Wang et al., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003)] 참조).

[0258] 일부 실시양태에서, 중합체는 수성 용액, 예컨대 물, 완충 염 용액, 또는 전하를 띤 측쇄가 있는 수성 알콜 용액, 또는 이의 1가 이온성 염에 적어도 부분적으로 가용성이다. 양이온과 반응될 수 있는 산성 측쇄가 있는 중합체의 예는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 아크릴산과 메타크릴산의 공중합체, 폴리(비닐 아세테이트), 및 술폰화 중합체, 예컨대 술폰화 폴리스티렌이다. 아크릴 및 메타크릴산 및 비닐 에테르 단량체 또는 중합체의 반응에 의해 형성된 산성 측쇄가 있는 공중합체가 또한 사용될 수 있다. 산성 기의 예는 카르복실산 기, 술폰산 기, 할로젠화 (바람직하게는 플루오르화) 알콜 기, 페놀성 OH 기, 및 산성 OH 기이다.

- [0259] 본 발명의 태반 줄기 세포 또는 이의 공동-배양물이 3차원 프레임워크 또는 스캐폴드 상에 파종되어 생체내로 이식될 수 있다. 이같은 프레임워크는 조직 형성을 자극하거나 또는 다른 방식으로 본 발명의 실행을 증강 또는 개선시키는 임의의 1가지 이상의 성장 인자, 세포, 약물 또는 기타 성분과 조합되어 이식될 수 있다.
- [0260] 본 발명에서 사용될 수 있는 스캐폴드의 예로는 부직 매트(mat), 다공성 포말체, 또는 자가-어셈블링 펩티드가 포함된다. 부직 매트는 글리콜산 및 락트산의 합성 흡수성 공중합체 (예를 들어, PGA/PLA)로 구성된 섬유 (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, NJ.)를 사용하여 형성될 수 있다. 동결-건조 또는 냉동건조공건조와 같은 공정에 의해 형성된, 폴리(ϵ -카프로락톤)/폴리(글리콜산) (PCL/PGA) 공중합체로 예를 들어 구성된 포말체 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,355,699 참조)가 또한 스캐폴드로 사용될 수 있다.
- [0261] 또한 본 발명의 태반 줄기 세포는 모노-, 디-, 트리-, 알파-트리, 베타-트리, 및 테트라-칼슘 포스페이트, 히드록시아파타이트, 플루오로아파타이트, 황산칼슘, 플루오르화칼슘, 산화칼슘, 탄산칼슘, 마그네슘 칼슘 포스페이트, 생물학적으로 활성인 유리 예컨대 BIOGLASS®, 및 이들의 혼합물이 포함되지만 이에 한정되지 않는 생리학적으로 허용가능한 세라믹 재료 상에 파종되거나 이와 접촉될 수 있다. 현재 시판되는 다공성 생체적합성 세라믹 재료에는 SURGIBONE® (CanMedica Corp., Canada), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, France), CEROS® (Mathys, AG3 Bettlach, Switzerland), 및 무기질화 콜라겐 골 이식 제품 예컨대 HEALOS™ (DePuy, Inc., Raynham, MA) 및 VITOSS®, RHAKOSS™, 및 CORTOSS® (Orthovita, Malvern, Pa.)이 포함된다. 프레임워크는 천연 및/또는 합성 재료의 혼합물, 블렌드 또는 복합물일 수 있다.
- [0262] 또다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 생체흡수성 재료 예컨대 PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 블렌드, 또는 히알루론산으로부터 제조된 멀티필라멘트사로 예를 들어 구성될 수 있는 펠트 상에 파종되거나 또는 이와 접촉될 수 있다.
- [0263] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 태반 줄기 세포는 복합 구조물일 수 있는 포말체 스캐폴드 상에 파종될 수 있다. 이같은 포말체 스캐폴드는 유용한 형상, 예컨대 복구, 대체 또는 증대될 신체 내의 특정 구조물의 일부분의 형상으로 성형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 프레임워크가 세포 부착을 증강시키기 위해 본 발명의 세포의 접촉 전에, 예를 들어, 0.1 M 아세트산으로 처리된 후, 폴리아민, PBS, 및/또는 콜라겐에서 인큐베이션된다. 매트릭스의 외부 표면이, 예컨대 매트릭스의 혈장-코팅, 또는 1가지 이상의 단백질 (예를 들어, 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유), 당단백질, 글리코사미노글리칸 (예를 들어, 헤파린 황산염, 콘드로이틴-4-황산염, 콘드로이틴-6-황산염, 더마틴 황산염, 케라틴 황산염 등), 세포 매트릭스, 및/또는, 젤라틴, 알기네이트, 한천, 아가로스 및 식물 고무 등과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 기타 물질의 첨가에 의해, 세포의 부착 또는 성장 및 조직의 분화를 개선시키기 위해 변형될 수 있다.
- [0264] 일부 실시양태에서, 스캐폴드는 이를 비-혈전형성성하도록 하는 재료를 포함하거나 이러한 재료로 처리될 수 있다. 이러한 처리 및 재료는 내피 성장, 이동, 및 세포외 매트릭스 침착을 또한 촉진하고 유지시킬 수 있다. 이러한 재료 및 처리의 예로는 천연 재료 예컨대 기저막 단백질 예컨대 라미닌 및 IV형 콜라겐, 합성 재료 예컨대 EPTFE, 및 분절형 폴리우레탄 실리콘, 예컨대 PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.)이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 스캐폴드는 항-혈전제 예컨대 헤파린을 또한 포함할 수 있다; 또한 스캐폴드는 태반 줄기 세포로의 파종 전에 표면 전하가 변경되도록 처리될 수 있다 (예를 들어, 혈장으로 코팅됨).
- [0265] 5.7.3 불멸화 태반 줄기 세포주
- [0266] 성장-촉진 유전자, 즉, 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성이 외부 인자에 의해 조절가능하도록, 형질감염된 세포의 성장을 적합한 조건 하에 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 임의의 적절한 벡터로의 형질감염에 의해 포유류 태반 세포가 조건부로 불멸화될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 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.
- [0267] 성장-촉진 단백질의 외부 조절은 성장-촉진 유전자를 외부-조절가능 프로모터, 예를 들어, 형질감염된 세포의 온도 또는 세포와 접촉되는 배지의 조성을 변화시킴으로써 예를 들어 활성이 제어될 수 있는 프로모터의 제어 하에 놓음으로써 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 테트라사이클린 (tet)-제어 유전자 발현 시스템이 사용될 수 있다 ([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 부재 하에, 이러한 벡터 내의 tet-제어 트랜스액티베이터(transactivator) (tTA)가 tet 오퍼레이터 서열에 융합된 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 최소 프로

모터인 ph_{CMV*-1} 로부터의 전사를 강력하게 활성화시킨다. tTA는 대장균의 트랜스포존-10-유래 tet 저항성 오페론의 억제인자 (tetR)와 단순 포진 바이러스의 VP16의 산성 도메인의 융합 단백질이다. tet의 낮은 비-독성 농도 (예를 들어, 0.01-1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 tTA에 의한 트랜스액티베이션이 거의 완전히 폐지된다.

[0268] 한 실시양태에서, 박터는 선별가능 마커, 예를 들어, 약물 저항성을 부여하는 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 함유한다. 박테리아성 네오마이신 저항성 유전자 (neo^R)는 본 발명에서 사용될 수 있는 한 이같은 마커이다. neo^R 을 지니는 세포는 당업자에게 공지된 수단, 예컨대 성장 배지에 예를 들어 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 G418을 첨가하는 것에 의해 선별될 수 있다.

[0269] 형질감염은 레트로바이러스 감염이 포함되지만 이에 한정되지 않는, 당업자에게 공지된 다양한 수단들 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있다. 일반적으로, 박터에 대한 생산자 세포주로부터 수집된 조건화 배지와 N2 보충물을 함유하는 DMEM/F12의 혼합물과의 인큐베이션에 의해 세포 배양물이 형질감염될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이 제조된 태반 세포 배양물이 1 부피의 조건화 배지 및 2 부피의 N2 보충물을 함유하는 DMEM/F12에서의 약 20시간 동안의 인큐베이션에 의해 시험관내에서 예를 들어 5일 후에 감염될 수 있다. 그후, 선별가능 마커를 지니는 형질감염된 세포가 상기 기술된 바와 같이 선별될 수 있다.

[0270] 형질감염 후, 증식을 허용하는, 예를 들어, 세포의 30% 이상이 24시간의 기간 내에 2배가 되도록 하는 표면에 배양물이 계대된다. 바람직하게는, 기관은 폴리오르니틴 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및/또는 라미닌 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 코팅된 조직 배양 플라스틱으로 구성된 폴리오르니틴/라미닌 기관, 폴리라이신/라미닌 기관 또는 피브로넥틴으로 처리된 표면이다. 그후, 1가지 이상의 증식-증강 인자가 보충되었거나 보충되지 않았을 수 있는 성장 배지가 배양물에 3-4일마다 공급된다. 배양물이 50% 미만의 전면성장일 때 증식-증강 인자가 성장 배지에 첨가될 수 있다.

[0271] 80-95% 전면성장되었을 때, 표준 기술을 사용하여, 예컨대 트립신처리에 의해 조건부로 불멸화된 태반 줄기 세포주가 계대될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 20회의 계대까지, 선별 (예를 들어, 네오마이신 저항성 유전자를 함유하는 세포에 대한 G418의 첨가에 의해)을 유지하는 것이 유리하다. 또한 장기 보관을 위해 세포를 액체 질소 내에 동결시킬 수 있다.

[0272] 상기 기술된 바와 같이 제조된 조건부로 불멸화된 인간 태반 줄기 세포주로부터 클론 세포주가 단리될 수 있다. 일반적으로, 이같은 클론 세포주가 표준 기술을 사용하여, 예컨대 제한 희석에 의해 또는 클로닝 링(cloning ring)을 사용하여 단리되어 확장될 수 있다. 일반적으로 클론 세포주는 상기 기술된 바와 같이 공급 및 계대될 수 있다.

[0273] 클론성일 수 있지만 반드시 클론성일 필요는 없는, 조건부로 불멸화된 인간 태반 줄기 세포주는 분화를 용이하게 하는 배양 조건 하에 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성을 억제함으로써 분화되도록 일반적으로 유도될 수 있다. 예를 들어, 성장-촉진 단백질을 코딩하는 유전자가 외부적으로 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있는 경우, 조건, 예를 들어, 온도 또는 배지의 조성을 변형하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제할 수 있다. 상기 논의된 테트라사이클린-제어 유전자 발현 시스템에 대해, 테트라사이클린을 첨가하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제함으로써 분화가 달성될 수 있다. 일반적으로, 4-5일 동안의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 테트라사이클린이 분화를 개시시키는데 충분하다. 추가적인 분화를 촉진하기 위해, 추가적인 작용제가 성장 배지에 포함될 수 있다.

[0274] 5.7.4 분석법

[0275] 본 발명의 태반 줄기 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 줄기 세포와 비교하여 결정하는 분석법에서 사용될 수 있다.

[0276] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 태반 줄기 세포가 분자와의 접촉 시 증식, 확장 또는 분화에서의 변화에 대해 분석된다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 본 발명은 다수의 태반 줄기 세포를 증식을 허용하는 조건 하에 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 화합물이 상기 화합물과 접촉되지 않은 다수의 줄기 세포와 비교하여 상기 다수의 줄기 세포의 증식에서 검출가능한 변화를 야기하는 경우, 상기 화합물이 태반 줄기 세포의 증식을 조정하는 화합물로서 확인되는, 다수의 태반 줄기 세포의 증식을 조정하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 증식 억제제로서 확인된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 증식 증강제로서 확인된다.

[0277] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 다수의 태반 줄기 세포를 확장을 허용하는 조건 하에 화합물과 접촉시키는 단

계를 포함하고, 이때 상기 화합물이 상기 화합물과 접촉되지 않은 다수의 줄기 세포와 비교하여 상기 다수의 줄기 세포의 확장에서 검출가능한 변화를 야기하는 경우, 상기 화합물이 태반 줄기 세포의 확장을 조정하는 화합물로서 확인되는, 다수의 태반 줄기 세포의 확장을 조정하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 확장 억제제로서 확인된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 확장 증강제로서 확인된다.

[0278] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 태반 줄기 세포를 분화를 허용하는 조건 하에 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 화합물이 상기 화합물과 접촉되지 않은 줄기 세포와 비교하여 상기 줄기 세포의 분화에서 검출가능한 변화를 야기하는 경우, 상기 화합물이 태반 줄기 세포의 분화를 조정하는 화합물로서 확인되는, 태반 줄기 세포의 분화를 조정하는 화합물을 확인하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 분화 억제제로서 확인된다. 또다른 특정 실시양태에서, 상기 화합물은 분화 증강제로서 확인된다.

[0279] 6. 실시예

[0280] 6.1 실시예 1: 태반 줄기 세포의 배양

[0281] 태반 줄기 세포를 산후 포유류 태반으로부터 관류에 의해 또는 물리적 파괴, 예를 들어, 효소성 소화에 의해 수득하였다. 세포를 60% DMEM-LG (Gibco), 40% MCDB-201 (Sigma), 2% 소 태아 혈청 (FCS) (Hyclone Laboratories), $1 \times$ 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS), $1 \times$ 레놀렌산-소 혈청 알부민 (LA-BSA), 10^{-9} M 텍사메타손 (Sigma), 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (Sigma), 표피 성장 인자 (EGF) 10 ng/ml (R&D Systems), 혈소판 유래-성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems), 및 100U 페니실린/1000U 스트렙토마이신을 포함하는 배양 배지에서 배양하였다.

[0282] 세포가 배양되는 배양 플라스크를 하기와 같이 준비하였다. 5 ng/ml 인간 FN (Sigma F0895)을 함유하는 5 ml PBS를 플라스크에 첨가함으로써 T75 플라스크를 피브로넥틴 (FN)으로 코팅하였다. FN 용액이 있는 플라스크를 37°C에서 30분 동안 방치하였다. 그후, FN 용액을 세포 배양 전에 제거하였다. 처리 후 플라스크를 건조시킬 필요는 없었다. 별법적으로, 플라스크를 FN 용액과 접촉시켜 4°C에서 하룻밤 이상 동안 방치하였다; 배양 전에, 플라스크를 가운하고, FN 용액을 제거하였다.

[0283] 관류에 의해 단리된 태반 줄기 세포

[0284] 태반 관류액으로부터의 태반 줄기 세포의 배양물이 하기와 같이 수립되었다. 피콜 구배로부터의 세포를 상기와 같이 제조된 FN-코팅 T75 플라스크에 $50-100 \times 10^6$ 개의 세포/플라스크로 15 ml 배양 배지에 파종하였다. 전형적으로, 5 내지 10개의 플라스크에 파종하였다. 플라스크를 37°C에서 12-18시간 동안 인큐베이션하여, 부착성 세포가 부착되도록 하였다. 10 ml의 따뜻한 PBS를 각각의 플라스크에 첨가하여, 현탁액 내의 세포를 제거하고, 부드럽게 혼합하였다. 그후, 15 ml의 배지를 제거하고, 15 ml의 신선한 배양 배지로 교체하였다. 모든 배지를 배양 시작 후 3-4일에 교환하였다. 후속 배양 배지 교환을 수행하는 동안, 배지의 50% 또는 7.5 ml를 제거하였다.

[0285] 약 제12일에 시작하여, 배양물을 현미경 하에 점검하여 부착성 세포 콜로니의 성장을 시험하였다. 세포 배양물이 약 80% 전면성장되었을 때 (전형적으로 배양 시작 후 제13일 내지 제18일 사이), 부착성 세포를 트립신 소화에 의해 수확하였다. 이러한 1차 배양물로부터 수확된 세포를 계대 0으로 지정하였다.

[0286] 물리적 파괴 및 효소성 소화에 의해 단리된 태반 줄기 세포

[0287] 소화된 태반 조직으로부터 태반 줄기 세포 배양물이 하기와 같이 수립되었다. 관류된 태반을 무균성 종이 시트 상에 모체 측면을 위로 하여 놓았다. 태반의 모체 측면 상의 표면층 약 0.5 cm를 칼날로 긁어 내고, 이 칼날을 사용하여 약 $1 \times 2 \times 1$ cm 치수의 태반 조직 덩어리를 제거하였다. 그후, 이러한 태반 조직을 약 1 mm³ 조각들로 다졌다. 이러한 조각들을 50 ml 팔콘(Falcon) 튜브 내로 수집하고, 수조 내에서 37°C에서, 콜라게나제 IA (2 mg/ml, Sigma)로 30분 동안, 이어서 트립신-EDTA (0.25%, GIBCO BRL)로 10분 동안 소화시켰다. 생성된 용액을 400g에서 10분 동안 실온에서 원심분리하고, 소화 용액을 제거하였다. 펠렛을 PBS로 약 10배 부피로 재현탁시키고 (예를 들어, 5 ml 펠렛을 45 ml PBS로 재현탁시킴), 튜브를 400g에서 10분 동안 실온에서 원심분리하였다. 조직/세포 펠렛을 130 ml 배양 배지에 재현탁시키고, 세포를 피브로넥틴-코팅 T-75 플라스크 당 13 ml로 파종하였다. 세포를 37°C에서 5% CO₂의 습식 대기에서 인큐베이션하였다. 이러한 단계에서 임의로 태반 줄기 세포를 냉동보존하였다.

- [0288] 태반 줄기 세포의 계대배양(subculturing) 및 확장
- [0289] 냉동보존된 세포를 37℃ 수조에서 신속하게 해동시켰다. 태반 줄기 세포를 10 ml의 따뜻한 배지로 냉동 바이알로부터 즉각 제거하여, 15 ml 무균성 튜브로 옮겼다. 세포를 400g에서 10분 동안 실온에서 원심분리하였다. 세포를 10 ml의 따뜻한 배양 배지 내에 피펫팅에 의해 재현탁시키고, 생육성 세포수를 트립판 블루 배제에 의해 결정하였다. 그 후, 세포를 약 6000-7000개의 세포/cm²로 상기와 같이 제조된 FN-코팅 플라스크에 파종하였다 (약 5×10^5 개의 세포/T-75 플라스크). 세포를 37℃, 5% CO₂ 및 90% 습도에서 인큐베이션하였다. 세포가 75-85% 전면성장에 도달하였을 때, 모든 소비된 배지를 무균적으로 플라스크로부터 제거하여 폐기하였다. 0.25% 트립신/EDTA (w/v) 용액 3 ml를 첨가하여 세포층을 덮고, 세포를 37℃, 5% CO₂ 및 90% 습도에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 플라스크를 1회 또는 2회 가볍게 두드려서, 세포 탈착을 촉진하였다. >95%의 세포가 둥글고 탈착되면, 7 ml의 따뜻한 배양 배지를 각각의 T-75 플라스크에 첨가하고, 세포층 표면 상에 여러번 피펫팅함으로써 용액을 분산시켰다.
- [0290] 상기와 같이 세포를 계수하고 생육력을 결정한 후, 세포를 1000 RPM에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다. 한 T-75 플라스크로부터의 세포 펠렛을 배양 배지로 부드럽게 재현탁시키고, 세포를 2개의 FN-코팅 T-75 플라스크 상에 균일하게 플레이팅함으로써, 세포를 계대시켰다
- [0291] 상기 방법을 사용하여, 마커 CD105, CD33, CD73, CD29, CD44, CD10, 및 CD90을 발현하는 대표적인 부착성 태반 줄기 세포 집단이 확인되었다. 이러한 세포 집단은 전형적으로 CD34, CD45, CD117 또는 CD133을 발현하지 않았다. 이러한 태반 줄기 세포들의 전부는 아니지만 일부 배양물은 HLA-ABC 및/또는 HLA-DR을 발현하였다.
- [0292] **6.2 실시예 2: 태반 구조물로부터의 태반 줄기 세포의 단리**
- [0293] 6.2.1 재료 & 방법
- [0294] 6.2.1.1 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 줄기 세포 집단의 단리
- [0295] 별개의 태반 세포 집단들을 정상적인 만삭 임신으로부터 수득하였다. 모든 기증자들은 이들의 태반을 연구 목적으로 사용하는 것에 대한 완전한 서면 동의서를 제공하였다. 태반 줄기 세포를 하기의 공급원으로부터 수득하였다: (1) 태반 관류액 (태반 혈관계의 관류로부터); 및 (2) 양막, (3) 용모막, (4) 양막-용모막판, 및 (5) 제대의 효소성 소화물. 다양한 태반 조직들을 무균성 PBS (Gibco-Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)에서 세정하고, 별도의 무균성 펠트리 접시 상에 놓았다. 다양한 조직들을 무균성 수술용 칼(scalpel)로 다지고, 50 ml 원추형 팔콘 튜브 내에 놓았다. 다져진 조직들을 IX 콜라게나제 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)로 20분 동안 37℃ 수조에서 소화시키고, 원심분리한 후, 0.25% 트립신-EDTA (Gibco-Invitrogen Corp)로 10분 동안 37℃ 수조에서 소화시켰다. 소화 후다양한 조직들을 원심분리하고, 무균성 PBS (Gibco-Invitrogen Corp)로 1회 행겼다. 그 후, 재구성된 세포들을 100 μ m 세포 스트레이너(strainer)로 1번, 30 μ m 분리 필터로 1번으로 2회 여과하여, 임의의 잔류 세포와 매트릭스 또는 세포 잔해물을 제거하였다.
- [0296] 6.2.1.2 세포 생육력 평가 및 세포수
- [0297] 수동 트립판 블루 배제 방법을 소화 후에 사용하여 세포수를 결정하고 세포 생육력을 평가하였다. 세포들을 트립판 블루 염료 (Sigma- Aldrich)와 1:1의 비율로 혼합하고, 세포들을 혈구계 상에서 판독하였다.
- [0298] 6.2.1.3 세포 표면 마커 특성화
- [0299] HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺인 세포를 특성화를 위해 선별하였다. 이러한 표현형을 갖는 세포를 FACSCalibur 및 FACS Aria의 2가지 벡톤-딕킨슨(Becton-Dickinson) 유세포측정기 (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)에 의해 확인, 정량 및 특성화하였다. 다양한 태반 세포를 30분 동안 실온에서 웨이커 상에서 세포 백만개 당 항체 약 10 μ l의 비율로 염색하였다. 하기의 항-인간 항체를 사용하였다: HLA-G (Serotec, Raleigh, NC), CD105 (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA), CD44 (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), 및 CD105 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)에 대한 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 접합 모노클로날 항체; CD44, CD200, CD117, 및 CD13에 대한 피코에리트린 (PE) 접합 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 피코에리트린-Cy5 (PE Cy5) 접합 스트렙타비딘 및 CD117에 대한 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); CD33 및 CD10에 대한 피코에리트린-Cy7 (PE Cy7) 접합 모노클로날 항체 (BD Biosciences); 알로 피코시아닌 (APC) 접합 스트렙타비딘 및 CD38에 대한 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 및 비오틴화 CD90 (BD Biosciences Pharmingen). 인큐베이션 후, 세포를 1회 헹구서 결합되지 않은 항체를 제거하고,

하룻밤 동안 4% 파라포름알데히드 (USB, Cleveland, OH)로 4℃에서 고정시켰다. 다음날, 세포를 2회 행구고, 30 μ m 분리 필터로 여과하고, 유세포측정기(들) 상에 러닝(running)시켰다.

항-마우스 IgG 항체 (BD Biosciences Pharmingen)로 염색된 샘플이 음성 대조군으로 사용되었고, 하였고, 광증 배관 (PMT)을 조정하는데 사용되었다. 항-인간 항체로 단일 염색된 샘플이 양성 대조군으로 사용되었고, 스펙 트럼 중첩/보상을 조정하는데 사용되었다.

6.2.1.4 세포 분류 및 배양

태반 세포의 한 세트 (관류액, 양막, 또는 융모막 유래)를, 임의의 배양 전에, 7-아미노-악티노마이신 D (7AAD; BD Biosciences Pharmingen) 및 당해 표현형에 특이적인 모노클로날 항체로 염색하였다. 세포를 세포 백만개 당 항체 10 μ l의 비율로 염색하고, 30분 동안 실온에서 웨이커 상에서 인큐베이션하였다. 그 후, 이러한 세포 들을 BD FACS Aria 상에서 당해 표현형을 나타내는 살아 있는 세포에 대해 양성으로 분류하고, 배양물 내로 플 레이팅하였다. 분류된 태반 세포 집단 (당해 집단) 및 "전체" (분류되지 않은) 태반 세포 집단을 비교를 위해 플레이팅하였다. 세포를 피브로넥틴 (Sigma-Aldrich)이 코팅된 96웰 플레이트 상에 표 1에 열거된 세포 밀도 (세포/ cm^2)로 플레이팅하였다. 세포 밀도, 및 어떤 세포 유형이 이중으로 또는 삼중으로 플레이팅되었는지는 당 해 표현형을 나타내는 세포의 수에 의해 결정되고 좌우되었다.

표 1

96웰 플레이트 배양물			
플레이팅된 세포의 밀도			
조건	분류됨	전체	전체 최고 밀도
세포 공급원	관류액		
세트 #1	40.6 K/ cm^2	40.6 K/ cm^2	93.8 K/ cm^2
세트 #2	40.6 K/ cm^2	40.6 K/ cm^2	93.8 K/ cm^2
세트 #3	40.6 K/ cm^2	40.6 K/ cm^2	93.8 K/ cm^2
세포 공급원	양막		
세트 #	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2
세트 #2	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2
세포 공급원	융모막		
세트 #1	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2
세트 #2	6.3 K/ cm^2	6.3 K/ cm^2	62.5 K/ cm^2

완전 배지 (60% DMEM-LG (Gibco) 및 40% MCDB-201 (Sigma); 2% 소 태아 혈청 (Hyclone Labs.); 1× 인슐린- 트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1× 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10⁻⁹ M 텍사메타손 (Sigma); 10⁻⁴ M 아스코르 브산 2-포스페이트 (Sigma); 표피 성장 인자 10 ng/ml (R&D Systems); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/ml (R&D Systems))를 96웰 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 5% CO₂/37℃ 인큐베이터 내에 놓았다. 제7일에, 완전 배지 100 μ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 96웰 플레이트를 약 2주 동안 모니터링하고, 배양물의 최종 평가를 제12일에 완료하였다. 이는 태반 줄기 세포 배양에서 매우 초기이고, 계대 0 세포를 나타냈다.

6.2.1.5 데이터 분석

FACSCalibur 데이터를 FlowJo (Tree star, Inc)에서 표준 게이팅(gating) 기술을 사용하여 분석하였다. BD FACS Aria 데이터를 FACSDiva 소프트웨어 (Becton- Dickinson)를 사용하여 분석하였다. FACS Aria 데이터를 더블렛(doublet)을 최소화하는 더블렛 차별 게이팅, 뿐만 아니라 표준 게이팅 기술을 사용하여 분석하였다. 모 든 결과를 마이크로 엑셀에서 편집하였고, 본원에서의 모든 값들은 평균 $\pm$ 표준 편차 (수치, 평균의 표준 오차)로 표시된다.

6.2.2 결과

6.2.2.1 세포 생육력

소화후 생육력을 수동 트립판 블루 배제 방법을 사용하여 평가하였다 (도 1). 대다수의 소화된 조직 (양막, 융 모막 또는 양막-융모막판)으로부터 수득된 세포의 평균 생육력은 약 70%였다. 양막의 평균 생육력은 74.35% $\pm$ 10.31% (n=6, SEM=4.21)이었고, 융모막의 평균 생육력은 78.18% $\pm$ 12.65% (n=4, SEM=6.32)였으며, 양막- 융모막판의 평균 생육력은 69.05% $\pm$ 10.80% (n=4, SEM=5.40)였고, 제대의 평균 생육력은 63.30% $\pm$ 20.13

% (n=4, SEM=10.06)였다. 소화가 진행되지 않은, 관류로부터의 세포가 최고의 평균 생육력인 $89.98 \pm 6.39\%$ (n=5, SEM=2.86)를 유지하였다.

[0310] 6.2.2.2 세포 정량

[0311] HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 수를 결정하기 위해 태반 세포 및 제대 세포의 집단을 분석하였다. BD FACSCalibur 데이터의 분석으로부터, 양막, 관류액, 및 용모막이 각각 30.72 ± 21.80 개의 세포 (n=4, SEM=10.90), 26.92 ± 22.56 개의 세포 (n=3, SEM=13.02), 및 18.39 ± 6.44 개의 세포 (n=2, SEM=4.55)로 가장 큰 총수의 이러한 세포들을 함유하였음이 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음). 양막-용모막판 및 제대는 각각 4.72 ± 4.16 개의 세포 (n=3, SEM=2.40) 및 3.94 ± 2.58 개의 세포 (n=3, SEM=1.49)로 가장 적은 총수의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였다 (데이터는 제시되지 않음).

[0312] 유사하게, 당해 표현형을 나타내는 전체 세포의 백분율을 분석하였을 때, 양막 및 태반 관류액이 각각 $0.0319\% \pm 0.0202\%$ (n=4, SEM=0.0101) 및 $0.0269\% \pm 0.0226\%$ (n=3, SEM=0.0130)으로 가장 높은 백분율의 이러한 표현형을 나타내는 세포를 함유하였음이 관찰되었다 (도 2). 제대는 작은 갯수의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였지만, $0.020 \pm 0.0226\%$ (n=3, SEM=0.0131)로 세번째로 높은 백분율의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였다 (도 2). 용모막 및 양막-용모막판은 각각 $0.0184 \pm 0.0064\%$ (n=2, SEM=0.0046) 및 $0.0177 \pm 0.0173\%$ (n=3, SEM=0.010)로 가장 낮은 백분율의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였다 (도 2).

[0313] BD FACSCalibur 분석 결과와 일치하여, BD FACS Aria 데이터에서 양막, 관류액, 및 용모막이 나머지 공급원보다 더 높은 갯수의 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포를 제공하는 것으로 또한 확인되었다. 양막, 관류액, 및 용모막의 당해 표현형을 나타내는 세포의 평균 총수는 각각 126.47 ± 55.61 개의 세포 (n=15, SEM=14.36), 81.65 ± 34.64 개의 세포 (n=20, SEM=7.75), 및 51.47 ± 32.41 개의 세포 (n=15, SEM=8.37)였다 (데이터는 제시되지 않음). 양막-용모막판 및 제대는 각각 44.89 ± 37.43 개의 세포 (n=9, SEM=12.48) 및 11.00 ± 4.03 개의 세포 (n=9, SEM=1.34)로 가장 작은 총수의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였다 (데이터는 제시되지 않음).

[0314] BD FACS Aria 데이터는 관류액 및 양막에서 각각 $0.1523 \pm 0.0227\%$ (n=15, SEM=0.0059) 및 $0.0929 \pm 0.0419\%$ (n=20, SEM=0.0094)로 최고 백분율의 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포가 생산되었음을 나타냈다 (도 3). 양막-용모막판은 $0.0632 \pm 0.0333\%$ (n=9, SEM=0.0111)로 세번째로 높은 백분율의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였다 (도 3). 용모막 및 제대는 각각 $0.0623 \pm 0.0249\%$ (n=15, SEM=0.0064) 및 $0.0457 \pm 0.0055\%$ (n=9, SEM=0.0018)로 최저 백분율의 당해 표현형을 나타내는 세포를 함유하였다 (도 3).

[0315] 각각의 세포 공급원으로부터 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포를 확인 및 정량한 후, 세포 표면 마커 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200, 및 CD105의 발현에 대해 세포를 추가로 분석 및 특성화하였다.

[0316] 6.2.2.3 태반 관류액-유래 세포

[0317] 관류액-유래 세포는 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, 및 CD13에 대해 일관적으로 양성이었다 (도 4). 관류액-유래 세포에 대한 각각의 마커의 평균 발현은 하기와 같았다: $37.15\% \pm 38.55\%$ (n=4, SEM=19.28)의 세포가 HLA-G를 발현하였고; $36.37\% \pm 21.98\%$ (n=7, SEM=8.31)의 세포가 CD33을 발현하였고; $39.39\% \pm 39.91\%$ (n=4, SEM=19.96)의 세포가 CD117을 발현하였고; $54.97\% \pm 33.08\%$ (n=4, SEM=16.54)의 세포가 CD10을 발현하였고; $36.79\% \pm 11.42\%$ (n=4, SEM=5.71)의 세포가 CD44를 발현하였고; $41.83\% \pm 19.42\%$ (n=3, SEM=11.21)의 세포가 CD200을 발현하였고; $74.25\% \pm 26.74\%$ (n=3, SEM=15.44)의 세포가 CD90을 발현하였고; $35.10\% \pm 23.10\%$ (n=3, SEM=13.34)의 세포가 CD38을 발현하였고; $22.87\% \pm 6.87\%$ (n=3, SEM=3.97)의 세포가 CD105를 발현하였고; $25.49\% \pm 9.84\%$ (n=3, SEM=5.68)의 세포가 CD13을 발현하였다.

[0318] 6.2.2.4 양막-유래 세포

[0319] 양막-유래 세포는 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, 및 CD13에 대해 일관적으로 양성이었다 (도 5). 양막-유래 세포에 대한 각각의 마커의 평균 발현은 하기와 같았다: $57.27\% \pm 41.11\%$ (n=3, SEM=23.73)의 세포가 HLA-G를 발현하였고; $16.23\% \pm 15.81\%$ (n=6, SEM=6.46)의 세포가 CD33을 발현하였고; $62.32\% \pm 37.89\%$ (n=3, SEM=21.87)의 세포가 CD117을 발현하였고; $9.71\% \pm 13.73\%$ (n=3, SEM=7.92)의 세포가 CD10을 발현하였고; $27.03\% \pm 22.65\%$ (n=3, SEM=13.08)의 세포가 CD44를 발현하였고;

6.42% $\pm$ 0.88% (n=2, SEM=0.62)의 세포가 CD200을 발현하였고; 57.61% $\pm$ 22.10% (n=2, SEM=15.63)의 세포가 CD90을 발현하였고; 63.76% $\pm$ 4.40% (n=2, SEM=3.11)의 세포가 CD38을 발현하였고; 20.27% $\pm$ 5.88% (n=2, SEM=4.16)의 세포가 CD105를 발현하였고; 54.37% $\pm$ 13.29% (n=2, SEM=9.40)의 세포가 CD13을 발현하였다.

[0320] 6.2.2.5 용모막-유래 세포

[0321] 용모막-유래 세포는 HLA-G, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, 및 CD13에 대해 일관적으로 양성인 한편, CD33, 및 CD105의 발현은 차이가 있었다 (도 6). 용모막 세포에 대한 각각의 마커의 평균 발현은 하기와 같았다: 53.25% $\pm$ 32.87% (n=3, SEM=18.98)의 세포가 HLA-G를 발현하였고; 15.44% $\pm$ 11.17% (n=6, SEM=4.56)의 세포가 CD33을 발현하였고; 70.76% $\pm$ 11.87% (n=3, SEM=6.86)의 세포가 CD117을 발현하였고; 35.84% $\pm$ 25.96% (n=3, SEM=14.99)의 세포가 CD10을 발현하였고; 28.76% $\pm$ 6.09% (n=3, SEM=3.52)의 세포가 CD44를 발현하였고; 29.20% $\pm$ 9.47% (n=2, SEM=6.70)의 세포가 CD200을 발현하였고; 54.88% $\pm$ 0.17% (n=2, SEM=0.12)의 세포가 CD90을 발현하였고; 68.63% $\pm$ 44.37% (n=2, SEM=31.37)의 세포가 CD38을 발현하였고; 23.81% $\pm$ 33.67% (n=2, SEM=23.81)의 세포가 CD105를 발현하였고; 53.16% $\pm$ 62.70% (n=2, SEM=44.34)의 세포가 CD13을 발현하였다.

[0322] 6.2.2.6 양막-용모막관-유래 세포

[0323] 양막-용모막관으로부터의 세포는 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105, 및 CD13에 대해 일관적으로 양성이었다 (도 7). 양막-용모막관-유래 세포에 대한 각각의 마커의 평균 발현은 하기와 같았다: 78.52% $\pm$ 13.13% (n=2, SEM=9.29)의 세포가 HLA-G를 발현하였고; 38.33% $\pm$ 15.74% (n=5, SEM=7.04)의 세포가 CD33을 발현하였고; 69.56% $\pm$ 26.41% (n=2, SEM=18.67)의 세포가 CD117을 발현하였고; 42.44% $\pm$ 53.12% (n=2, SEM=37.56)의 세포가 CD10을 발현하였고; 32.47% $\pm$ 31.78% (n=2, SEM=22.47)의 세포가 CD44를 발현하였고; 5.56% (n=1)의 세포가 CD200을 발현하였고; 83.33% (n=1)의 세포가 CD90을 발현하였고; 83.52% (n=1)의 세포가 CD38을 발현하였고; 7.25% (n=1)의 세포가 CD105를 발현하였고; 81.16% (n=1)의 세포가 CD13을 발현하였다.

[0324] 6.2.2.7 제대-유래 세포

[0325] 제대-유래 세포는 HLA-G, CD33, CD90, CD38, CD105, 및 CD13에 대해 일관적으로 양성인 한편, CD117, CD10, CD44, 및 CD200의 발현은 차이가 있었다 (도 8). 제대-유래 세포에 대한 각각의 마커의 평균 발현은 하기와 같았다: 62.50% $\pm$ 53.03% (n=2, SEM=37.50)의 세포가 HLA-G를 발현하였고; 25.67% $\pm$ 11.28% (n=5, SEM=5.04)의 세포가 CD33을 발현하였고; 44.45% $\pm$ 62.85% (n=2, SEM=44.45)의 세포가 CD117을 발현하였고; 8.33% $\pm$ 11.79% (n=2, SEM=8.33)의 세포가 CD10을 발현하였고; 21.43% $\pm$ 30.30% (n=2, SEM=21.43)의 세포가 CD44를 발현하였고; 0.0% (n=1)의 세포가 CD200을 발현하였고; 81.25% (n=1)의 세포가 CD90을 발현하였고; 64.29% (n=1)의 세포가 CD38을 발현하였고; 6.25% (n=1)의 세포가 CD105를 발현하였고; 50.0% (n=1)의 세포가 CD13을 발현하였다.

[0326] 모든 마커 발현 평균의 요약이 도 9에서 제시된다.

[0327] 6.2.2.8 BD FACS Aria 분류 보고서

[0328] 가장 큰 백분율의 HLA ABC, CD45, CD34, 및 CD133를 발현한 태반 세포 (관류액, 양막 및 용모막으로부터의 세포)의 3개의 별개의 집단을 7AAD 및 이러한 마커들에 대한 항체로 염색하였다. 3개의 집단이 당해 표현형을 나타내는 살아 있는 세포에 대해 양성으로 분류되었다. BD FACS Aria 분류의 결과가 표 2에 열거된다.

표 2

[0329]

BD FACS Aria 분류 보고서			
세포 공급원	프로세싱된 이벤트	분류된 이벤트 (당해 표현형)	전체에 대한 %
관류액	135540110	51215	0.037786
양막	7385933	4019	0.054414
용모막	108498122	4016	0.003701

[0330] 양성으로 분류된 세포 ("분류됨") 및 이들의 상응하는 분류되지 않은 세포의 3개의 별개의 집단을

플레이팅하고, 배양 결과를 제12일에 평가하였다 (표 3). 40,600/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된, 분류된 관류액-유래 세포에서 작고, 둥글며 비-부착성인 세포가 초래되었다. 각각 40,600/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된, 분류되지 않은 관류액-유래 세포의 3개의 셋트 중 2개에서 대부분 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었고, 몇몇 부착성 세포가 웰의 가장자리 주변에 위치하였다. 93,800/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류되지 않은 관류액-유래 세포에서 대부분 작고, 둥글며 비-부착성인 세포가 초래되었고, 몇몇 부착성 세포가 웰 가장자리 주변에 위치하였다.

[0331] 6,300/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류된 양막-유래 세포에서 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었다. 6,300/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류되지 않은 양막-유래 세포에서 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었다. 62,500/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류되지 않은 양막-유래 세포에서 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었다.

[0332] 6,300/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류된 융모막-유래 세포에서 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었다. 6,300/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류되지 않은 융모막-유래 세포에서 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었다. 62,500/cm²의 세포 밀도로 플레이팅된 분류되지 않은 융모막-유래 세포에서 작고, 둥글며, 비-부착성인 세포가 초래되었다.

[0333] 상기 관련된 실험의 수행, 및 태반 줄기 세포의 추가적인 배양에 이어서, CD117 및 CD133에 대한 항체의 표지화 (스트렙타비딘-접합 항체가 비오틴-접합 피코에리트린 (PE)으로 표지됨)가 양성 관독값을 갖는데 충분히 유의한 배경을 생산하였는지가 결정되었다. 초기에 이러한 배경으로 양쪽 마커에 대해 양성인 것으로 생각되는 태반 줄기 세포가 초래되었다. 상이한 표지인 APC 또는 PerCP가 사용되었을 때, 배경이 감소되었고, 태반 줄기 세포가 CD117 및 CD133 모두에 대해 음성인 것으로 정확하게 결정되었다.

[0334] 6.3 실시예 3: 태반 줄기 세포 및 제대 줄기 세포의 특성화

[0335] 본 실시예는 태반 줄기 세포의 대표적인 세포 표면 마커 프로파일을 설명한다.

[0336] 배양 배지 내의 효소성 소화에 의해 수득된 태반 줄기 세포 또는 제대 줄기 세포를 2 ml 2% FBS-PBS를 첨가하고 400g에서 5분 동안 원심분리함으로써 1회 세정하였다. 상청액을 따라버리고, 펠렛을 100-200 μ l의 2% FBS-PBS에 재현탁시켰다. 100 μ l의 2% FBS-PBS를 각각의 튜브에 첨가하고, 완전한 1방울 (약 60 μ l)의 BD™ CompBeads 음성 대조군 및 1방울의 BD™ CompBeads 항-마우스 비드를 첨가하고, 와동(vortexing)시킴으로써, 4개의 튜브를 BD™ CompBeads (Cat# 552843)로 준비시켰다. BD™ CompBeads의 4개의 튜브에, 하기의 항체들을 첨가하였다:

튜브#	항체	카탈로그#	클론	부피 (μ l)
1	CD105 FITC	FAB10971F	166707	10
2	CD200 PE	552475	MRC-OX-104	20
3	CD10 PE-Cy7	341102	HI10a	5
4	CD34 APC	340667	8G12	5

[0337]

[0338] 대조군 튜브를 하기와 같이 제조하였다:

튜브#	항체	카탈로그#	클론	부피 (μ l)
1	염색되지 않음	-	-	-
2	IgG FITC/IgG PE/ IgG APC	555787, 555786, 550931	G18-145	각각 10

[0339]

[0340] 하기의 항체들을 샘플 튜브에 첨가하였다:

항체	카탈로그#	클론	부피 (μ l)
CD105 FITC	FAB10971F	166707	10
CD200 PE	552475	MRC-OX-104	20
CD10 PE-Cy7	341102	HI10a	5
CD34 APC	340667	8G12	5

[0341]

[0342] 대조군 및 샘플 튜브를 실온에서 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 2 ml 2% FBS-PBS를 첨가하고 400g에서 5분 동안 원심분리함으로써 튜브를 세정하였다. 상청액을 따라버리고, 펠렛을 100-200 μ l의

2% FBS-PBS에 재현탁시키고, 유세포측정기 상에서 포착하였다. 모든 다른 항체들을 이러한 절차에 따라 사용하였다.

[0343] 양막 및 제대 줄기 세포로부터의 매칭(matching)된 태반 줄기 세포를 형광-표지 항체 및 유세포측정을 사용하여 분석하여, 세포 표면 마커의 존재 또는 부재를 확인하였다. 분석된 마커에는 CD105 (증식 관련 내피 특이적 마커); CD200 (조절 기능과 관련된 마커); CD34 (내피 세포 및 조혈 줄기 세포 상에서 발현됨); CD10 (줄기 세포/전구 세포 마커); 사이토케라틴 K (상피 마커); CD44 (세포 이동, 림프구 귀향, 조혈); CD45 (계통 마커); CD133 (조혈 기원 세포에 대한 마커); CD117 (줄기 세포 인자 (c-Kit)); CD90 (정상적인 골수 내의 원시 조혈 줄기 세포, 제대혈 및 태아 간 세포 상에서 발현됨); HLA ABC (pan MHC I, 항원 제시, 면역원성); β -2-마이크로글로불린 (MHC I과 관련됨, 항원 제시, 면역원성); HLA DR,DQ,DP (pan MHC II, 항원 제시, 면역원성); 및 CD80/86 (항원-제시를 위한 공동-자극성 분자)이 포함되었다.

[0344] 유동세포측정 결과는, 테스트된 태반 줄기 세포에 대해, 93.83%의 세포가 CD105⁺이고, 90.76%의 세포가 CD200⁺이고, 86.93%의 세포가 CD105⁺ 및 CD200⁺임을 나타냈다. 99.97%의 세포가 CD10⁺였고, 99.15%의 세포가 CD34⁻였으며, 99.13%의 세포가 CD10⁺ 및 CD34⁻였다. 98.71%의 세포가 사이토케라틴 양성이었고, 99.95%의 세포가 CD44⁺였으며, 98.71%의 세포가 사이토케라틴 및 CD44 모두에 대해 양성이었다. 99.51%의 세포가 CD45⁻였고, 99.78%의 세포가 CD133에 대해 음성이었으며, 99.39%의 세포가 CD45 및 CD133 모두에 대해 음성이었다. 99.31%의 세포가 CD90에 대해 양성이었고, 99.7%가 CD117에 대해 음성이었으며, 99.01%가 CD90에 대해 양성이고 CD117에 대해 음성이었다. 95.7%의 세포가 CD80 및 CD86 모두에 대해 음성이었다.

[0345] 제대 줄기 세포에 대한 유동세포측정 결과는 95.95%의 세포가 CD200⁺이고, 94.71%가 CD105⁺이고, 92.69%가 CD105⁺ 및 CD200⁺임을 나타냈다. 99.93%의 세포가 CD10⁺였고, 99.99%의 세포가 CD34⁻였으며, 99.6%의 세포가 CD10⁺ 및 CD34⁻였다. 99.45%의 세포가 사이토케라틴 양성이었고, 99.78%의 세포가 CD44⁺였으며, 99.3%의 세포가 사이토케라틴 및 CD44 모두에 대해 양성이었다. 99.33%의 세포가 CD45⁻였고, 99.74%가 CD133⁻이었으며, 99.15%의 세포가 CD45⁻ 및 CD133⁻였다. 99.84%의 세포가 CD117⁻였고, 98.78%의 세포가 CD90⁺이었으며, 98.64%의 세포가 CD90⁺ 및 CD117⁻였다.

[0346] 한가지 표현형 (CD200⁺, CD105⁺, CD10⁺, CD34⁻)이 수많은 이같은 분석에서 일관적으로 나타났다. 이러한 표현형은 CD90, CD44, HLA ABC (약함), β -2-마이크로글로불린 (약함), 및 사이토케라틴 K에 대해 추가적으로 양성 있었고, HLA DR,DQ,DP, CD117, CD133, 및 CD45에 대해 음성이었다.

[0347] 6.4 실시예 4: 태반 줄기 세포에서의 알데히드 탈수소효소 활성화의 결정

[0348] 줄기 세포 생장 능력의 잠재적인 마커인 알데히드 탈수소효소 (ALDH) 활성화의 수준을 ALDEFLUOR® 분석 키트 (Stem Cell Technologies, Inc.)를 사용하여 결정하였다. 전형적으로, 더욱 원시성이고 미분화된 세포는 더욱 분화된 줄기 세포보다 ALDH 활성을 덜 나타낸다.

[0349] 이 분석법은 형광 ALDH 기질인 ALDEFLUOR® (Aldagen, Inc., Durham, North Carolina)을 사용한다. 제조업자의 프로토콜은 하기와 같았다. 건식 ALDEFLUOR® 시약이 안정적인 불활성 형태로 제공된다. 건식 화합물을 디메틸설폭시드 (DMSO)에 용해시키고 2N HCl을 첨가함으로써 ALDEFLUOR®이 활성화되고, 즉각적으로 세포에 첨가된다. 세포를 ALDEFLUOR® + ALDH의 특이적 억제제인 DEAB와 조합함으로써 대조군 튜브를 또한 수립하였다.

[0350] 분석된 세포에는 양막-용모막관으로부터의 4개의 제대 줄기 세포주 및 3개의 태반 줄기 세포주, 골수-유래 중간엽 줄기 세포주 (BM-MSC), 지방세포-유래 줄기 세포주 (ADSC), 인간 용모 영양막 세포주 (HVT), 및 제대혈로부터의 CD34⁺ 줄기 세포가 포함되었다.

[0351] 분석은 하기와 같이 진행되었다. ALDEFLUOR® 분석 키트에서 제공된 분석 완충제로 샘플 농도를 1×10^6 개의 세포/ml로 조정하였다. 조정된 세포 현탁액 1 ml를 각각의 테스트된 세포주에 대한 실험 튜브 및 대조군 튜브 내로 첨가하고, 5 μ l의 DEAB를 대조군으로 표지된 대조군 튜브에 추가적으로 첨가하였다.

[0352] 25 μ l의 DMSO를 건식 ALDEFLUOR® 시약에 첨가함으로써 ALDEFLUOR® 기질이 활성화되었고, 1분 동안 실온에서 방치되었다. 25 μ l의 2N HCl을 첨가하고, 잘 혼합하였다. 이러한 혼합물을 15분 동안 실온에서 인큐베이션하

었다. 360 μl 의 ALDEFLUOR® 분석 완충체를 바이알에 첨가하고, 혼합하였다. 생성된 혼합물을 사용하는 동안 2-8°C에서 보관하였다.

[0353] 샘플 1 ml 당 5 μl 의 활성화된 ALDEFLUOR® 시약을 실험 튜브에 첨가하고, 이러한 혼합물 0.5 ml를 대조군 튜브로 즉각적으로 옮겼다. 각각의 세포주에 대한 실험 튜브 및 대조군 튜브를 30분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 튜브를 400 $\times$ g에서 원심분리하고, 상청액을 따라버렸다. 생성된 펠렛 내의 세포를 0.5 ml 분석 완충제에 재현탁시키고, 유세포측정에 의해 분석하였다. 데이터를 FLOWJO™ 소프트웨어 (Tree Star, Ashland, Oregon)를 사용하여 분석하였다. SSC 대 FSC 및 SSC 대 FL1 플롯이 FLOWJO™ 워크스페이스에서 생성되었다. 대조군 및 실험 데이터 파일이 각각의 샘플에 대해 오픈되었고, 대조군 샘플을 기초로 적합한 게이트(gate)가 결정되었다. 양성 세포가 계수된 이벤트의 총수에서 백분율 ALDEFLUOR® 양성으로 계산되었다.

[0354] 태반 줄기 세포주는 약 3% 내지 약 25%의 ALDH 활성을 나타냈다 (3.53%, 8.76% 및 25.26%). 제대 줄기 세포주는 약 16% 내지 약 20%의 ALDH 활성을 나타냈다 (16.59%, 17.01%, 18.44% 및 19.83%). 대조적으로, BM-MSC 및 HVT는 각각 ALDH에 대해 음성 및 1.5%였지만, 지방-유래 MSC는 30% ALDH⁺에 근접하였다. 제대혈로부터 정제된 양성 대조군 CD34⁺ 세포는, 예상 대로, ALDH에 대해 고도로 양성이었다 (75%).

[0355] 6.5 실시예 5: 폐쇄-회로 관류에 의한 태반 줄기 세포의 수집

[0356] 본 실시예는 관류에 의해 태반 줄기 세포를 획득하는 한 방법을 설명한다.

[0357] 산후 태반을 출생 후 24시간 이내에 획득하였다. 제대를 태반 원반에 대해 약 3 내지 4인치에서 제대 집게로 잡고, 제대를 집게 위에서 절단하였다. 제대는 폐기되거나, 또는 제대 줄기 세포를 예를 들어 회수하기 위해, 및/또는 제대 막을 생체 재료의 생산을 위해 프로세싱하기 위해 프로세싱된다. 과량의 양막 및 융모막을 태반으로부터 절단하여, 태반의 가장자리 주변의 약 ¼ 인치만을 남겼다. 잘려진 물질은 폐기하였다.

[0358] 태반 막의 가장자리로부터 시작하여, 손가락으로의 비절개 박리를 사용하여 양막을 융모막으로부터 분리하였다. 양막이 융모막으로부터 전체적으로 분리되면, 양막을 제대의 바닥 주변에서 가위로 절단하고, 태반 원반으로부터 탈착시켰다. 양막은 폐기 또는 프로세싱될 수 있고, 예를 들어, 효소성 소화에 의해 줄기 세포를 획득하기 위해, 또는 양막 생체재료를 예를 들어 생산하기 위해 프로세싱될 수 있다.

[0359] 나머지 태반 물질의 태아 측면에서 모든 눈에 보이는 혈병 및 잔류 혈액을 무균성 거즈를 사용하여 깨끗이 한 후, 알콜 면봉보다는 요오드 면봉으로 닦음으로써 멸균시켰다. 그 후, 제대를 제대 집게 아래에서 무균성 지혈기로 엇갈리게 잡고, 제대를 집게 위로 잡아당기면서 지혈기를 회전시켜 주름(fold)을 생성시켰다. 그 후, 제대를 지혈기 아래에서 부분적으로 절단하여, 집게에 의해 지지된 제대의 단면을 노출시켰다. 별법적으로, 제대를 무균성 지혈기로 집었다. 그 후, 제대를 무균성 거즈 상에 놓고, 지혈기로 홀딩하여 장력을 제공하였다. 그 후, 제대를 지혈기 아래에서 곧장 직선으로 절단하고, 혈관 근처의 제대의 가장자리를 다시 집었다.

[0360] 상기 기술된 바와 같이 노출된 혈관, 일반적으로 1개의 정맥 및 2개의 동맥을 확인하고, 하기와 같이 개방시켰다. 집게로 혈관 벽이 천공되지 않도록 주의하면서, 단힌 악어집 집게를 각각의 혈관의 절단 끝부분을 통해 전진시켰다. 집게의 끝이 제대의 바닥의 약간 위에 있을 때 삼입을 중단하였다. 집게를 약간 열고, 혈관으로부터 천천히 빼내어서, 혈관을 팽창시켰다.

[0361] 관류 기구 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 튜빙을 각각의 태반 동맥 내로 삽입하였다. 250 ml 수집 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입하였다. 튜빙을 공간 내로 테이핑(taping)하였다.

[0362] 누수를 점검하기 위한 소량의 무균성 주사 등급 0.9% NaCl 용액. 누수가 존재하지 않으면, 펌프 속도를 증가시키고, 약 750 ml의 주사 등급 0.9% NaCl 용액을 태반 혈관계에 펌핑하였다. 바깥쪽 가장자리에서 제대로 태반 원반을 부드럽게 마사지함으로써 관류를 도울 수 있다. 수집 백이 찬 경우, 튜빙을 백에 연결하는 커플러로부터 백을 제거하고, 새로운 백을 튜브에 연결하였다.

[0363] 수집이 종결되면, 수집 백을 청량하고, 원심분리를 위해 균형을 맞췄다. 원심분리 후, 세포 펠렛을 파괴하지 않으면서 각각의 백을 혈장 추출기 내에 놓았다. 그 후, 백 내의 상청액을 제거하여 폐기하였다. 그 후, 백을 부드럽게 마사지하여 세포를 나머지 상청액 내에 재현탁시켰다. 무균성 1 ml 주사기를 사용하여, 약 300-500 μl 의 세포를 샘플링 부위 커플러를 통해 수집 백으로부터 빼내고, 1.5 ml 원심분리 튜브로 옮겼다. 나머지 관류액의 중량 및 부피를 결정하고, 1/3 부피의 헤타스타치(hetastarch)를 관류액에 첨가하고 철저히 혼합하였다. ml 당 세포의 수를 결정하였다. 혈장 추출기를 사용하여 관류액으로부터 적혈구를 제거하였다.

[0364] 그후, 태반 세포를 즉각적으로 배양하여 태반 줄기 세포를 단리하거나, 또는 추후의 사용을 위해 냉동보존하였다.

[0365] 6.6 실시예 6: 태반 줄기 세포의 분화

[0366] 6.6.1 뉴런으로의 분화의 유도

[0367] 태반 줄기 세포의 뉴런성 분화가 또한 하기와 같이 달성될 수 있다:

[0368] 1. DMEM/20% FBS 및 1 mM 베타 메르캅토에탄올로 구성된 예비인큐베이션 배지에서 태반 줄기 세포를 24시간 동안 성장시켰다.

[0369] 2. 예비인큐베이션 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 세정하였다.

[0370] 3. DMEM 및 1-10 mM 베타메르캅토에탄올로 구성된 뉴런 유도 배지를 세포에 첨가하였다. 별법적으로, DMEM/2% DMSO/200 μ M 부틸화 히드록시아니솔로 구성된 유도 배지를 사용할 수 있다.

[0371] 4. 특정 실시양태에서, 형태학적 및 분자성 변화가 무혈청 배지 및 베타메르캅토에탄올에의 노출 후 60분에 발생할 수 있다. RT/PCR을 사용하여 예를 들어, 신경 성장 인자 수용체 및 신경미세섬유 중쇄 유전자의 발현을 평가할 수 있다.

[0372] 6.6.2 지방세포로의 분화의 유도

[0373] 50-70% 전면성장의, 양막의 효소성 소화로부터 유래된 태반 줄기 세포의 여러 배양물을 (1) DMEM/MCDB-201 + 2% FCS, 0.5% 히드로코르티손, 0.5 mM 이소부틸메틸잔틴 (IBMX), 60 μ M 인도메타신; 또는 (2) DMEM/MCDB-201 + 2% FCS 및 0.5% 리놀레산을 포함하는 배지에서 유도하였다. 세포를 형태학적 변화에 대해 시험하였다; 3-7 일 후, 오일 액적이 나타났다. 지방발생과 관련된 특정 유전자, 즉, PPAR- γ 2, aP-2, 지질단백질 리파제, 및 오스테오폰틴의 발현을 시험하는 정량적 실시간 PCR에 의해 분화를 또한 평가하였다. 태반 줄기 세포의 2개의 배양물이 지방세포-특이적 유전자의 발현에서 각각 6.5배 및 24.3배 증가를 나타냈다. 4개의 다른 배양물들은 지방발생의 유도 후 PPAR- γ 2의 발현에서 중등도의 증가 (1.5-2.0배)를 나타냈다.

[0374] 또다른 실시양태에서, 관류액으로부터 수득된 태반 줄기 세포를 DMEM/MCDB-201 (답 섬유모세포 기본 배지) + 2% FCS에서 배양하였다. 세포를 트립신처리하고, 원심분리하였다. 세포를 지방-유도 배지 (AIM) 1 또는 2에 재현탁시켰다. AIM1은 중간엽 줄기 세포 지방발생성 보충물 (StemCell Technologies)이 보충된 인간 중간엽 줄기 세포에 대한 메센컬트(MesenCult) 기초 배지 (StemCell Technologies)로 구성되었다. AIM2는 DMEM/MCDB-201 + 2% FCS 및 LA-BSA (1%)를 포함하였다. 약 1.25×10^5 개의 태반 줄기 세포를 T-25 플라스크 내의 5 ml AIM1 또는 AIM2에서 성장시켰다. 세포를 인큐베이터 내에서 7-21일 동안 배양하였다. 오일-레드 염색에 의해 확인되는 바와 같이, 세포에서 오일 액적 공포(空胞)가 세포질 내에 발달되었고, 이는 줄기 세포의 지방세포로의 분화를 시사하였다.

[0375] 태반 줄기 세포의 지방발생성 분화가 또한 하기와 같이 달성될 수 있다:

[0376] 1. 태반 줄기 세포를 15% 제대혈 혈청이 보충된 DMEM 또는 MSCGM (Cambrex)에서 성장시켰다.

[0377] 2. 유도/유지의 3회 사이클이 사용되었다. 각각의 사이클은 태반 줄기 세포에 지방발생 유도 배지 (Cambrex)를 공급하고, 세포를 3일 동안 배양한 후 (37°C, 5% CO₂), 1-3일 동안 지방발생 유지 배지 (Cambrex)에서 배양하는 것으로 구성되었다. 사용될 수 있는 별법적인 유도 배지는 1 μ M 텍사메타손, 0.2 mM 인도메타신, 0.01 mg/ml 인슐린, 0.5 mM IBMX, DMEM-고 글루코스, FBS5 및 항생제를 함유하였다.

[0378] 3. 유도/유지의 3회의 완전한 사이클 후, 배지를 2-3일 마다 교체하면서 세포를 추가로 7일 동안 지방발생 유지 배지에서 배양하였다.

[0379] 4. 지방발생의 보증서는 친지성 염색 오일 레드 O를 사용하여 쉽게 관찰할 수 있는 다수의 세포질내 지질 소포의 발생이었다. 지방세포로 분화하기 시작한 태반 줄기 세포에서 리파제 및/또는 지방산 결합 단백질 유전자의 발현이 RT/PCR에 의해 확인되었다.

[0380] 6.6.3 골세포로의 분화의 유도

[0381] 골발생성 배지를 185 ml Cambrex 분화 기초 배지 - 골발생성 및 SingleQuot들 (각각 텍사메타손, 1-글루타민, 아스코르베이트, 페니실린/스트렙타비딘, MCGS, 및 β -글리세로포스페이트)로부터 제조하였다. 관류액으로부터

의 태반 줄기 세포를 조직 배양 표면적 1 cm² 당 약 3×10^3 개의 세포의 세포로 조직 배양 면적 1 cm² 당 0.2-0.3 ml의 MSCGM 내에 플레이팅하였다. 전형적으로, 모든 세포가 MSCGM, 37°C, 5% CO₂에서 4-24시간 동안 배양 표면에 부착하였다. 배지를 골발생 분화 배지로 교체함으로써 골발생 분화가 유도되었다. 무기질화가 동반되면서, 세포 형태학이 부착성 태반 줄기 세포의 전형적인 방추-형상의 외양에서 입방형 외양으로 변하기 시작하였다. 일부 세포는 분화 동안 조직 배양 표면으로부터 얇은 층으로 분리되었다.

[0382] 골발생 분화가 또한 하기와 같이 달성될 수 있다:

[0383] 1. 태반 줄기 세포의 부착성 배양물을 15% 제대혈 혈청이 보충된 DMEM 또는 MSCGM (Cambrex)에서 배양하였다.

[0384] 2. 배양물을 24시간 동안 조직 배양 플라스크에서 배양하였다.

[0385] 3. MSCGM을 0.1 μM 텍사메타손, 0.05 mM 아스코르브산-2-포스페이트, 10 mM 베타 글리세로포스페이트를 함유하는 골발생 유도 배지 (Cambrex)로 교체함으로써 골발생 분화를 유도하였다..

[0386] 4. 2-3주 동안 세포에 골발생 유도 배지를 3-4일마다 공급하였다.

[0387] 5. 칼슘-특이적 염색 및 알칼리성 포스파타제 및 오스테오폰틴 유전자 발현에 대한 RT/PCR을 사용하여 분화를 분석하였다.

[0388] 6.6.4 췌장성 세포로의 분화의 유도

[0389] 췌장성 분화가 하기와 같이 달성되었다:

[0390] 1. 태반 줄기 세포를 염기성 섬유모세포 성장 인자 (10 ng/ml); 및 전환 성장 인자 베타-1 (2 ng/ml)이 보충된 DMEM/20% CBS에서 배양하였다. 녹아웃 혈청 대체물이 CBS 대신 사용될 수 있다.

[0391] 2. 네스틴-양성 뉴런 세포 세포 배양물로부터의 조건화 배지를 배지에 50/50 농도로 첨가하였다.

[0392] 3. 3-4일 마다 재공급하면서, 세포를 14-28일 동안 배양하였다.

[0393] 4. RT/PCR에 의해 인슐린 단백질 또는 인슐린 유전자 발현에 대해 분석함으로써 분화를 특성화하였다.

[0394] 6.6.5 심장 세포로의 분화의 유도

[0395] 근육성 (심장발생성) 분화가 하기와 같이 달성되었다:

[0396] 1. 태반 줄기 세포를 레티노산 (1 μM); 염기성 섬유모세포 성장 인자 (10 ng/ml); 및 전환 성장 인자 베타-1 (2 ng/ml); 및 표피 성장 인자 (100 ng/ml)가 보충된 DMEM/20% CBS에서 배양하였다. 녹아웃 혈청 대체물 (Invitrogen, Carlsbad, California)이 CBS 대신 사용될 수 있다.

[0397] 2. 별법적으로, 태반 줄기 세포를 50 ng/ml 카디오트로핀(Cardiotropin)-1이 보충된 DMEM/20% CBS에서 24시간 동안 배양하였다.

[0398] 3. 별법적으로, 태반 줄기 세포를 단백질이 없는 배지에서 5-7일 동안 유지시킨 후, 인간 심근 추출물로 자극하였다 (용량을 상승시키는 분석법). 심근 추출물은 1 gm 인간 심근을 1 % 제대혈 혈청이 보충된 1 % HEPES 완충제 내에서 균질화시킴으로써 생산되었다. 현탁액을 60분 동안 인큐베이션한 후, 원심분리하고, 상청액을 수집하였다.

[0399] 4. 3-4일마다 재공급하면서 세포를 10-14일 동안 배양하였다.

[0400] 5. RT/PCR에 의한 심장 액틴 유전자 발현의 증명에 의해 분화를 확인하였다.

[0401] 6.6.6 연골세포로의 분화의 유도

[0402] 6.6.6.1 일반적인 방법

[0403] 태반 줄기 세포의 연골발생성 분화가 일반적으로 하기와 같이 달성되었다:

[0404] 1. 태반 줄기 세포를 15% 제대혈 혈청이 보충된 DMEM 또는 MSCGM (Cambrex)에서 유지시켰다.

[0405] 2. 태반 줄기 세포를 무균성 폴리프로필렌 튜브 내로 분취하였다. 세포를 원심분리하고 (150×g, 5분), 불완전 연골발생 배지 (Cambrex)에서 2회 세정하였다.

[0406] 3. 마지막 세정 후, 세포를 0.01 μg/ml TGF-베타-3를 함유하는 완전 연골발생 배지 (Cambrex)에 5×10^5 개의

세포/ml의 농도로 재현탁시켰다.

[0407] 4. 0.5 ml의 세포를 15 ml 폴리프로필렌 튜브 내로 분취하였다. 세포를 150×g에서 5분 동안 펠렛화시켰다. 펠렛을 배지에서 그대로 방치하였다.

[0408] 5. 느슨하게 뚜껑이 덮인 튜브를 37℃, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0409] 6. 세포 펠렛에 2-3일 마다 신선하게 제조된 완전 연골발생 배지를 공급하였다.

[0410] 7. 저속 와동기를 사용하여 매일 진탕에 의해 펠렛을 배지 내에 현탁되게 유지시켰다.

[0411] 8. 연골발생성 세포 펠렛을 배양물에서 14-28일 후 수확하였다.

[0412] 9. 예를 들어, 호산성 기저물질의 생산의 관찰, 세포 형태학의 평가, 및/또는 콜라겐 2 및 콜라겐 9 유전자 발현의 RT/PCR 확인, 및/또는 알시안(Alcian) 블루 세포화학 염색에 의해 확인되는 바와 같은 연골 매트릭스 산점액다당류의 생산에 의해, 연골발생을 특성화하였다.

[0413] 6.6.6.2 태반 및 제대 줄기 세포의 연골발생성 세포로의 분화

[0414] 본 실시예는 태반 줄기 세포의 연골발생성 세포로의 분화 및 이같은 세포로부터의 연골-유사 조직의 발달을 설명한다.

[0415] 연골은 신경 공급이 없는 무혈관, 무림프 조직이다. 연골은 연골세포 밀도가 낮지만 (<5%), 이러한 세포들은 이들 주변의 세포와 매트릭스를 유지하는데 의외로 효율적이다. 3가지 주요 유형의 연골이 신체 내에 존재한다: (1) 관절에서의 관절 윤활을 용이하게 하는 관절 연골; (2) 예를 들어 반월판 및 추간판에서, 충격 흡수를 제공하는 섬유연골; 및 (3) 예를 들어 코 및 귀에서, 해부학적 구조를 제공하는 탄력 연골. 모든 3가지 유형의 연골은 생화학적 구조가 유사하다.

[0416] 관절 통증은 장애의 주요 원인이고, 정형외과학 분야에서의 경감에 대한 충족되지 않은 요구를 제공한다. 1차 골관절염 (관절 퇴행을 야기할 수 있음), 및 외상이 통증의 2가지 통상적인 원인이다. 미국 인구의 약 9%가 엉덩이 또는 무릎 골관절염에 걸렸고, 매년 200만회를 초과하는 무릎 수술이 수행된다. 불행하게도, 현재의 치료는 연골의 복구보다는 증상의 치료를 향해 더욱 조정된다. 천연 복구는 섬유모세포-유사 세포가 영역을 침습하여 이를 섬유성 조직으로 채울 때 발생하는데, 이러한 섬유성 조직은 정상 조직처럼 탄력성 또는 탄성이 아니며, 더 많은 손상을 야기한다. 조직 이식, 연골하 천공(drilling), 또는 전체 관절 교체가 역사적으로 치료 선택권에 포함되었다. 그러나 더욱 최근의 치료는 자가 연골세포 주사인 CARTICEL®; 일시적인 통증 경감을 위한 히알루론산 주사인 SYNVISCO® 및 ORTHOVISCO®; 및 반월판 복구를 위한 성체 중간엽 줄기 세포의 주사인 CHONDROGEN™를 포함한다. 일반적으로, 연골세포 또는 줄기 세포가 수반되는 세포 치료법 및/또는 조직 조작 산물을 더욱 향하는 경향이 있는 것으로 보인다.

[0417] 재료 및 방법

[0418] AC61665, P3 (계대 3) 및 AC63919, P5로 명명된 2개의 태반 줄기 세포주, 및 UC67249, P2 및 UC67477, P3으로 명명된 2개의 제대 줄기 세포주를 하기 개요된 연구에서 사용하였다. 인간 중간엽 줄기 세포 (MSC)가 양성 대조군으로 사용되었고, 및 골육종 세포주인 MC3T3, 및 인간 피부 섬유모세포 (HDF)가 음성 대조군으로 사용되었다.

[0419] 태반 및 제대 줄기 세포를 만삭 인간 태반으로부터 효소성 소화에 의해 분리 및 정제하였다. 인간 MSC 세포 및 HDF 세포는 Cambrex로부터 구입하였고, MC3T3 세포는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였다. 사용된 모든 세포주를 폴리프로필렌 원심분리 튜브에서 800 RPM에서 5분 동안 펠렛으로 원심분리하고, 연골발생성 유도 배지 (Cambrex) 및 비-유도성 기초 MSC 배지 (Cambrex) 모두에서 성장시켰다. 알시안 블루로 글리코스아미노글리칸 (GAG)에 대해 및/또는 시리우스 레드로 콜라겐에 대해 염색함으로써 7일, 14일, 21일 및 28일에 펠렛을 수확하여 조직학적으로 분석하였다. 콜라겐 유형을 면역염색으로 추가로 평가하였다. 연골-특이적 유전자에 대한 RNA 분석을 7일 및 14일에 수행하였다.

[0420] 결과

[0421] 실험 1 : 3가지 주요 목표를 달성하기 위해 연골발생 연구를 디자인하였다: (1) 태반 및 제대 줄기 세포가 분화되어 연골 조직을 형성할 수 있다는 것을 설명하기 위해; (2) 태반 및 제대 줄기 세포가 연골세포로 기능적으로 분화될 수 있다는 것을 설명하기 위해; 및 (3) 대조군 세포주를 평가함으로써 줄기 세포로 수득된 결과를 입증

하기 위해.

[0422] 목표 1을 위해, 예비 연구에서, 최종 농도 500 ng/ml의 골 형태발생 단백질 (BMP)과 함께 또는 없이, 세포 펠렛의 형태로 연골발생 유도 배지에서 1개의 태반 줄기 세포주가 배양되었다. 4주 동안 매주 연골발생 유도 증거에 대해 펠렛을 평가하였다. 결과는 경시적으로 펠렛의 크기가 증가하는 것을 가리켰다. 그러나, BMP⁺ 및 BMP⁻ 샘플 간에 시각적인 차이가 주지되지 않았다. 알시안 블루로 염색함으로써, 연골 조직의 지표인 GAG에 대해 펠렛을 또한 조직학적으로 분석하였다. 일반적으로 BMP⁺ 세포는 얇은 공포(空胞)가 있으면서 더욱 대사적으로 활성인 것으로 나타난 반면, BMP⁻ 세포는 진하게 염색된 핵 및 더 적은 세포질 (낮은 대사 활성을 반영함)을 나타내면서 더 작았다. 제7일에, BMP⁺ 세포는 진하게 청색으로 염색된 한편, BMP⁻는 희미하게만 염색되었다. 인큐베이션 제28일에, BMP⁺ 및 BMP⁻ 세포 모두 알시안 블루로 대략 동등하게 염색되었다. 결국, 세포 밀도가 경시적으로 감소하였고, 매트릭스가 펠렛을 추월하였다. 반면에, MC3T3 음성 세포주는 알시안 블루로 염색되었을 때 어떠한 GAG의 존재도 나타내지 않았다.

[0423] 실험 2: 실험 1의 결과를 기초로, 2개의 태반 줄기 세포 및 2개의 제대 줄기 세포주의 연골발생 분화 잠재력을 평가하기 위해 더욱 상세한 연구를 디자인하였다. 알시안 블루 조직학에 더하여, 제II형 콜라겐에 특이적인 시리우스 레드로 세포를 또한 염색하였다. 유도 배지와 함께 또는 없이, 각각의 세포주에 대해 다중 펠렛을 제조하였다

[0424] 먼저, 펠렛화된, 배양된 세포주를 거시적인 연골 생성에 대한 전반적인 관찰에 의해 평가하였다. 전체적으로, 줄기 세포주가 제1일에 펠렛을 만드는 것으로 관찰되었다. 이러한 펠렛이 경시적으로 성장하였고, 백색이고, 빛나며, 연골처럼 보이는, 단단한 매트릭스를 형성하였으며, 기계적으로 단단해졌다. 시각 검사에서, 태반 줄기 세포 또는 제대 줄기 세포로부터의 펠렛은 MSC 대조군보다 훨씬 더 컸다. 비-유도성 배지 내의 대조군 펠렛은 제11일에 흐트러지기 시작했고, 제28일에 연골발생 유도 배지에서 배양된 세포에 의해 발달된 펠렛보다 훨씬 작았다. 시각적으로, 태반 줄기 세포 또는 제대에 의해 형성된 펠렛들 간에 차이가 없었다. 그러나, 텍사 메타손이 없는 배지에서 시작된 UC67249 줄기 세포주는 더 큰 펠렛을 형성하였다. 음성 대조군 MC3T3 세포는 펠렛을 형성하지 않았다; 그러나, HDF는 펠렛을 형성하였다.

[0425] 그후, 모든 테스트 군으로부터의 대표적인 펠렛에 GAG 및 콜라겐에 대한 조직학적 분석을 적용하였다. 일반적으로, 유도성 조건 하에 줄기 세포에 의해 형성된 펠렛은 비-유도성 조건 하에 형성된 펠렛보다 더 컸고, 더 양호하게 계속 그대로였다. 유도성 조건 하에 형성된 펠렛은 GAG의 생산 및 제7일부터 경시적으로 증가하는 콜라겐 함량을 나타낸 반면, 비-유도성 조건 하에 형성된 펠렛은 약한 알시안 블루 염색에 의해 증명되는 바와 같이 콜라겐 생산을 거의 나타내지 않거나 나타내지 않았다. 일반적으로, hMSC에 비해, 태반 줄기 세포 및 제대 줄기 세포는, 시각 검사에서, 더 단단하고, 더 큰 펠렛을 생산하는 것으로 나타났고, 경시적으로 더 많은 콜라겐을 생산하는 것으로 나타났다. 또한, 연구 과정에 걸쳐, 콜라겐이 증점되는 것으로 나타났고, 편광 하에서의 섬유 색깔 변화로 입증되는 바와 같이 콜라겐 유형이 변하는 것으로 나타났다 (콜라겐 유형의 지표일 수 있는 섬유 두께와 색깔이 상호관련된다). 유도되지 않은 태반 줄기 세포는 유도된 줄기 세포와 비교하여 더 적은 제II형 콜라겐 (존재하는 경우)을 생산하였다. 28일 기간에 걸쳐, 연골 조직의 특성인 매트릭스 생산이 증가함에 따라 세포 밀도가 감소하였다.

[0426] 이러한 연구에서 태반 및 제대 줄기 세포가 연골발생 경로를 따라 분화될 수 있고, 연골 조직을 형성하도록 용이하게 유도될 수 있다는 것이 확인되었다. 초기의 관찰은 이같은 줄기 세포가 연골 조직의 형성을 위한 MSC에 바람직하다는 것을 가리킨다.

[0427] 6.7 실시예 7: 태반 줄기 세포의 현적 배양

[0428] 배양물 내의 부착성 태반 줄기 세포를 37°C에서 약 5분 동안 트립신처리하고, 두드러서 배양 접시로부터 떨어지게 하였다. 10% FBS를 배양물에 첨가하여, 트립신처리를 중지하였다. 세포를 약 1×10^4 개의 세포/ml로 약 5 ml의 배지에서 희석하였다. 액적 (단일 액적 또는 다중 채널 마이크로피펫으로부터의 액적들)을 100 ml 페트리 접시의 뚜껑의 안쪽 상에 놓았다. 뚜껑을 조심스럽게 뒤집고, 접시 대기 내의 수분 함량을 유지하기 위한 약 25 ml의 무균성 PBS를 함유하는 바닥 접시의 상부에 놓았다. 세포를 6-7일 동안 배양하였다.

[0429] 6.8 실시예 8: 태반 줄기 세포를 수득하기 위한 태반 조직 소화

- [0430] 본 실시예는 효소성 소화에 의한 태반 줄기 세포의 규모가 증진된 단리를 설명한다.
- [0431] 약 10 g의 태반 조직 (양막 및 융모막)을 수득하고, 침연시키고, 약 30 ml의 총부피 내의 동일한 부피의 콜라게나제 A (1 mg/ml) (Sigma) 및 트립신-EDTA (0.25%) (Gibco-BRL)를 사용하여 약 30분 동안 37°C에서 소화시켰다. 소화에 의해 유리된 세포를 배양 배지로 3× 세정하고, 4개의 T-225 플라스크에 분배하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 배양하였다. 태반 줄기 세포 수율은 출발 재료 10 g 당 약 4×10^8 내지 5×10^8 개의 세포였다. 계대 3에서 특성화된 세포는 주로 $CD10^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 및 $CD45^-$ 였다.
- [0432] **6.9 실시예 9: 냉동보존된 줄기 세포 생성물 및 줄기 세포 은행의 생산**
- [0433] 본 실시예는 태반 줄기 세포의 단리 및 동결된 줄기 세포-기반 생성물의 생산을 설명한다.
- [0434] **요약:** 태반 조직을 절개하고 소화시킨 후, 1차 및 확장 배양하여, 다수의 세포 용량을 생산하는 확장된 세포 생성물을 달성하였다. 세포를 2단 세포 은행에 보관하고, 동결된 세포 생성물로 분배하였다. 단일 기증자 태반으로부터 유래된 모든 세포 용량이 로트로 정의되었고, 전용실 및 클래스 100 층류 후드에서 무균성 기술을 사용하여 1개의 태반 로트를 한번에 프로세싱하였다. 세포 생성물은 핵형이 정상이고 모계 세포 함량이 없거나 실질적으로 없는 $CD105^+$, $CD200^+$, $CD10^+$, 및 $CD34^-$ 인 것으로 정의되었다.
- [0435] **6.9.1 줄기 세포의 수득**
- [0436] **조직 절개 및 소화:** 태반을 만들 후 24시간 내에 수득하였다. 태반 조직을 양막, 양막 및 융모막의 조합물, 또는 융모막으로부터 수득하였다. 조직을 약 1 mm 크기의 작은 조각으로 잘게 썰었다. 잘게 썰린 조직을 1 mg/ml 콜라게나제 1A로 1시간 동안 37°C에서 소화시킨 후, 트립신-EDTA로 30분 동안 37°C에서 처리하였다. PBS 내의 5% FBS에서 3회 세정한 후, 조직을 배양 배지에 재현탁시켰다.
- [0437] **1차 배양:** 1차 배양의 목적은 소화된 태반 조직으로부터 세포를 수립하는 것이었다. 소화된 조직을 배양 배지에 현탁시키고, 코닝(Corning) T-플라스크 내에 넣고, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 습식 챔버에서 인큐베이션하였다. 5일 배양 후, 배지의 절반을 보충하였다. 세포의 고밀도 콜로니가 배양 2주에 형성되었다. 콜로니들을 트립신-EDTA로 수확한 후, 이를 PBS 내의 2% FBS로 켄칭(quenching)하였다. 세포를 원심분리하고, 확장 배양물에 파종하기 위해 배양 배지에 재현탁시켰다. 이러한 세포들을 0회 배가된 계대 0 세포로 정의하였다.
- [0438] **확장 배양:** 1차 배양물로부터 수확되거나, 확장 배양물로부터 수확되거나, 또는 세포 은행으로부터 해동된 세포를 사용하여 확장 배양물에 파종하였다. 셀 팩토리 (NUNC™)를 무균성 필터를 통해 10분 동안 공기 중의 5% CO₂로 50 ml/분/트레이로 처리하고, 37°C, 5% CO₂로 유지되는 습식 인큐베이터에서 가온하였다. 세포 종자를 혈구계 상에서 트립판 블루로 계수하고, 세포수, 생육력, 계대수, 및 누적 배가 횟수를 기록하였다. 세포를 배양 배지에 약 2.3×10^4 개의 세포/ml로 현탁시키고, 110 ml/트레이를 셀 팩토리에 파종하였다. 3-4일 후 및 또 다시 배양 5-6일에, 배양 배지를 제거하고, 신선한 배지로 교체한 후, 공기 중의 5% CO₂로 또다시 처리하였다. 세포가 약 10^5 개의 세포/cm²에 도달했을 때, 세포를 트립신-EDTA로 수확한 후, PBS 내의 2% FBS로 켄칭하였다. 그후, 세포를 원심분리하고, 배양 배지에 재현탁시켰다.
- [0439] **냉동보존:** 동결될 세포를 트립신-EDTA로 배양물로부터 수확하고, PBS 내의 2% FBS로 켄칭하고, 혈구계 상에서 계수하였다. 원심분리 후, 세포를 세포 은행의 어셈블리에 사용될 세포에 대해서는 약 1백만 개의 세포/ml, 개별적인 동결된 세포 용량에 대해서는 천만개의 세포/ml의 농도로 FBS 내의 10% DMSO로 재현탁시켰다. 세포 용액을 -80°C 냉동기 내의 이소프로필 알콜 배스 내에 놓인 동결 컨테이너로 옮겼다. 다음날, 세포를 액체 질소로 옮겼다.
- [0440] **6.9.2 줄기 세포 은행의 디자인**
- [0441] "로트"는 단일 기증자 태반으로부터 유래된 모든 세포 용량으로 정의된다. 확장 배양 동안 8회의 계대 및 30회의 배가까지 세포가 정상적인 성장, 핵형, 및 세포 표면 마커 표현형을 유지하였다. 이러한 한계 하에, 용량은 5회의 계대 및 약 20회의 배가로부터의 세포를 포함하였다. 등가의 세포의 공급물을 생성시키기 위해, 단일 로트가 배양에서 확장되었고, 2단 세포 은행 및 동결된 용량으로 보관되었다. 특히, 0회 배가된 계대 0 세포로 정의된, 1차 배양으로부터 수확된 세포를 사용하여 확장 배양을 시작하였다. 1차 계대 후, 약 4회의 배가가 발생하였고, 세포를 마스터 세포 은행 (MCB)에 동결시켰다. MCB로부터의 바이알을 추가적인 확장 배양물에 파종

하는데 사용하였다. MCB로부터 해동된 세포의 2회의 추가적인 계대 후, 세포가 작업용 세포 은행 (WCB)에 동결되었고, 약 12회 누적 배가되었다. WCB로부터의 바이알을 또다른 2회 계대를 위한 확장 배양물에 파종하는데 사용하여, 약 20회 배가의 계대 5 세포가 초래되었고, 개별적인 용량으로 동결되었다.

[0442] 6.9.3 배양을 위한 세포 해동

[0443] 세포의 동결된 컨테이너를 밀봉된 플라스틱 백 내에 놓고, 37°C 수조에 함침시켰다. 작은 얼음 조각을 제외하고 모든 내용물이 녹을 때까지 컨테이너를 부드럽게 빙빙 돌렸다. 밀봉된 플라스틱 백으로부터 컨테이너를 제거하고, 10× 부피의 배양 배지를 부드럽게 혼합하면서 세포에 천천히 첨가하였다. 샘플을 혈구계에서 계수하고, 확장 배양물 내로 파종하였다.

[0444] 6.9.4 주사를 위한 세포 해동

[0445] 세포의 동결된 컨테이너를 건조 질소 운송물 내에서 투여 장소로 옮겼다. 투여 전에, 컨테이너를 밀봉된 플라스틱 백 내에 놓고, 37°C 수조에 함침시켰다. 작은 얼음 조각을 제외하고 모든 내용물이 녹을 때까지 컨테이너를 부드럽게 빙빙 돌렸다. 밀봉된 플라스틱 백으로부터 컨테이너를 제거하고, 동일한 부피의 2.5% HS A/5% 텍스트란을 첨가하였다. 추가로 세정하지 않고 세포를 주사하였다.

[0446] 6.9.5 테스트 및 상세사항

[0447] 모체 혈액 샘플이 모든 기준자 태반에 동반되었다. B형 간염 코어(core) 항체 및 표면 항원, C형 간염 바이러스 항체 및 핵산, 및 HIV I 및 II 항체 및 핵산에 대해 샘플을 스크리닝하였다. 테스트 결과를 받기 전에 태반 프로세싱 및 1차 배양을 시작하였지만, 모든 바이러스에 대해 음성인 모체 혈액 샘플 테스트와 관련된 태반에 대해서만 계속 진행하였다. 기준자 테스트가 임의의 병원체에 대해 양성이면 로트를 거부하였다. 또한, 표 3에 기술된 테스트를 MCB, WCB, 및 WCB의 바이알로부터 유래된 세포 용량 물질의 샘플에 대해 수행하였다. 모든 상세사항이 충족된 경우에만 로트를 방출하였다.

표 3

[0448]

세포 테스트 및 상세사항		
테스트	방법	필요한 결과
무균성	BD BACTEC PEDS PLUS/F 및 BACTEC Myco/F 용해성	음성
내독소	LAL 젤 클랏	≤5 EU/ml*
생육력	트립판 블루	>70% 생육성
마이코플라스마	직접 배양, DNA-플루오로크롬 (FDA PTC 1993)	음성
신원	유동세포측정 (하기 참조)	CD105 ⁺ , CD200 ⁺ , CD10 ⁺ , CD34 ⁻
세포 순도	마이크로세틀라이트 (microsatellite)	오염 세포가 검출되지 않음
핵형	중기 세포 상에서의 염색체 계수 및 G-밴딩(banding)	정상
* 40 ml의 동결 세포/용량인 것으로 디자인된 세포 생성물 및 최대 5 EU/ml에 대해, 체중이 40 kg을 초과하는 수용자에 대해 세포 생성물은 5 EU/kg/용량의 상한 미만이다.		

[0449] 6.9.6 세포 마커 표현형 분석

[0450] 세포를 PBS 내의 1% 파라포름알데히드 (PFA) 내에 20분 동안 놓고, 염색할 때까지 냉장고에서 보관하였다 (1주 이하). 세포를 PBS 내의 2% FBS, 0.05% 아지드화나트륨 (염색 완충제)으로 세정한 후, 염색 완충제 내에 재현탁시켰다. 세포를 하기의 항체 접합물로 염색하였다: CD105-FITC, CD200-PE, CD34-PECy7, CD10-APC. 또한 세포를 이소타입 대조군으로 염색하였다. 30분 인큐베이션 후, 세포를 세정하고, 염색 완충제로 재현탁시키고, 이어서 유동세포측정기 상에서 분석하였다. 이소타입 대조군과 비교하여 형광이 증가된 세포를 마커에 대해 양성으로 계수하였다.

[0451] **6.10 실시예 10: 태반 줄기 세포-특이적 유전자의 확인**

[0452] 양막-융모막 (AC) 및 제대 (UC)로부터의 태반 줄기 세포로부터의 유전자 발현 패턴을 중복성(multipotent) 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BM) 및 피부 섬유모세포 (DF) (최종적으로 분화된 것으로 간주됨)의 유전자 발현 패턴과 비교하였다. 세포를 단일 계대, 중등도의 계대, 및 다수의 계대 (노화까지의 계대 포함)로 성장시켰다. 결과는 계대 배가의 횟수가 유전자 발현에 큰 효과가 있다는 것을 가리켰다. AC 및 UC에서 상향 조절되고, BM 및 DF에서 하향 조절되거나 존재하지 않고, 계대 횟수와 상관 없이 발현되는 유전자 셋트를 확인하였다. 태반 줄기 세포- 또는 제대 줄기 세포-특이적 유전자의 이러한 셋트는 상피 세포와 관련된 다수의 세포골격 및 세포-대-세포 부착 단백질, 및 모체-태아 면역 내성에 관련된, 면역글로불린-유사 표면 단백질 CD200을 코딩한다. 태반 줄기 세포 및 제대 줄기 세포는 본 실시예에서 이하 AC/UC 줄기 세포로 총괄적으로 지칭될 것이다.

[0453] **6.10.1 재료 및 방법**

[0454] **6.10.1.1 세포 및 세포 배양**

[0455] BM (Cat# PT-2501) 및 DF (Cat# CC-2511)를 Cambrex로부터 구입하였다. AC 및 UC는 계대 0 조직 배양 플라스크로부터 유래되었다. 2063919로 지정된 기증자 태반으로부터 소화에 의해 플라스크 내의 AC 및 UC를 수득하였다. T-75 배양 플라스크에 6000개의 세포/cm²로 파종하고, 세포가 전면성장되었을 때 이를 계대시켰다. 개체수 배가를 트립산 블루 계수로부터 추정하였다. 3회, 11-14회, 및 24-38회의 개체수 배가 후 배양물을 유전자 발현에 대해 분석하였다.

[0456] **6.10.1.2 RNA, 마이크로어레이, 및 분석**

[0457] 용해 전에 트립신처리된 1개의 배양물을 제외하고, 세포를 조직 배양 플라스크에서 직접 용해시켰다. 전체 RNA를 RNeasy 키트 (QIAGEN)로 단리하였다. RNA 통합성 및 농도를 Agilent 2100 Bioanalyzer로 결정하였다. 각각의 배양물로부터의 10 µg의 전체 RNA를 Affymetrix GENECHIP® 플랫폼 상에 혼성화시켰다. 전체 RNA를 표지된 cRNA로 변환시키고, 올리고뉴클레오타이드 인간 게놈 U133A 2.0 어레이에 제조업자의 방법에 따라 혼성화시켰다. 이미지 파일을 Affymetrix MAS 5.0 소프트웨어로 프로세싱하고, Agilent GeneSpring 7.3 소프트웨어로 표준화시켜 분석하였다.

[0458] **6.10.2 결과**

[0459] **6.10.2.1 마이크로어레이 분석을 위한 BM-MS, AC/UC 줄기 세포, 및 DF 배양 시점의 선별**

[0460] AC/UC 줄기 세포에 독특한 유전자 발현 패턴을 수립하기 위해, 2개의 줄기 세포주 AC(6) 및 UC(6)을 BM-MS 및 DF와 평행하게 배양하였다. 세포 기원에 기인하는 유전자 발현 프로파일을 확인하는 것을 최대화하고, 외인성 영향을 최소화하기 위해, 모든 세포를 동일한 기준을 사용하여 동일한 배지에서 성장시키고, 파종하고, 계대-배양하였다. 3회의 개체수 배가, 11-14회 배가, 또는 35회 배가 또는 노화 (먼저 발생하는 것) 후 세포를 수확하였다. AC/UC 줄기 세포에서의 발현이 배양 시간에 의해 변하지 않고 BM 및 DF에 비해 상향조절된 유전자 AC/UC 줄기 세포-특이적 유전자에 대해 후보물이었다.

[0461] 도 10은 연구에서의 4개의 세포주에 대한 성장 프로파일을 나타낸다; 원은 어떤 배지가 RNA 단리를 위해 수확되었는지를 가리킨다. 전체적으로 총 20개의 샘플이 수집되었다. BM, AC(6), 및 UC(6)를 3회의 개체수 배가 후에 수확하였다; 이러한 샘플들은 배양에서 "단기" 배양으로 간주되었다. 단기 DF 샘플은 수집되지 않았다. 11 내지 14회 배가의 중기 배양물을 모든 세포 유형에 대해 수집하였다. 장기 배양물을 모든 세포주로부터 약 35회 개체수 배가 시에 또는 노화 직전에 수집하였다 (먼저 발생하는 것). 노화는 BM에 대해 15회 배가 전에, 그리고 DF에 대해 25회 배가 시에 발생하였다. 구입한 BM 및 DF 세포는 유전자 분석 전에 여러번 확장되었고, 초기 단계로 간주될 수 없었다. 그러나, 조작상, 3회 배가로 성장된 BM (BM-03)은 단기 배양물로 간주되었다. 유사하게, BM-11은 조작상 중기 배양물로 지칭되었지만, 노화가 14회 배가 시에 발생하였기 때문에, BM-11은 생물학적으로 장기 배양물일 수 있다.

[0462] **6.10.2.2 계층 클러스터링이 BM, AC/UC 줄기 세포, 및 DF 간의 관련성을 나타낸다.**

[0463] 마이크로어레이 분석으로 유전자 발현의 패턴이 확인되었고, 계층 클러스터링 (HC)으로 2가지 차원의 문맥에서 유사성을 발견하려고 시도하였다 - 첫번째 차원에서는 유전자, 두번째 차원에서는 상이한 조건 (상이한 RNA 샘플). 이러한 실험에서 사용된 유전자칩(GeneChip)은 22,000개를 초과하는 프로브 셋트 ("모든 유전자 목록"으로 지칭됨)를 함유하였지만, 이러한 셋트들 중 다수는 어떠한 조건에서도 발현되지 않는 유전자들을 질의한다. 모든 유전자 목록을 감소시키기 위해, 모든 샘플 내의 발현되지 않거나 낮은 수준 (250 미만의 원값)으로 발현

되는 유전자를 삭제하여 8,215개 유전자의 목록을 산출하였다.

[0464] 6.10.2.3 선 그래프 방식을 사용한 유전자 발현 분석

[0465] 8215개의 유전자의 유전자 발현 패턴이 GeneSpring에서 선 그래프 방식을 사용하여 디스플레이되었다 (도 11). x-축은 12가지의 실험 조건을 나타내고, y-축은 로그 스케일의 표준화된 프로브 셋트 발현값을 나타낸다. y-축은 10,000배 범위를 포괄하고, 발현되지 않거나 매우 낮은 수준으로 발현된 유전자는 0.01의 값으로 설정되었다. 디폴트(default)로, 표준화된 값은 1로 설정되었다. 각각의 선은 단일 유전자 (실제로는 프로브 셋트, 일부 유전자는 다중 프로브 셋트를 갖는다)를 나타내고, 모든 12가지의 조건에 걸쳐 단일 색상으로 이어진다. 열지도에 대해 기술된 바와 같이, 색상들이 상대적인 발현 수준을 묘사하지만, 착색 패턴은 1가지 조건을 선별함으로써 결정된다. AC-03이 도 11에서의 선별된 조건이었다. 표준화된 값에 비해 상향 조절된 유전자는 이러한 소프트웨어에 의해 적색으로 디스플레이되고, 하향 조절된 것들은 청색으로 디스플레이되었다. AC-03에서 UC-11까지의 명백한 위쪽 및 아래쪽을 향하는 스파이크들은 다수의 유전자들이 이러한 조건들에 걸쳐 차별적으로 발현되었음을 가리킨다. AC-03과 UC-03 간의 색상 패턴에서의 두드러진 유사성은 다수의 동일한 유전자들이 이러한 2가지 샘플에서 상향 또는 하향 조절되었음을 나타낸다. 수평선 구획은 유전자의 발현 패턴이 다수의 조건에 걸쳐 변하지 않았음을 가리킨다. 이는 UC-36, UC-38, 및 UC-38-T를 비교함으로써 가장 주목할 만하다. 명백한 스파이크는 없었지만, UC-36와 UC-38-T 사이의 다수의 적색 선이 표준화된 값 1 미만인 미세한 경향이 있었다. 이는 AC-03 및 UC-03에서 상향 조절된 이러한 유전자들이 추후의 배양에서 하향 조절되었음을 가리킨다. UC-38과 UC-38-T 간의 발현 패턴이 매우 유사하다는 사실은 RNA 단리 직전에 세포를 트립신처리하는 것이 유전자 발현에 대한 효과가 거의 없다는 것을 가리킨다.

[0466] 전산적으로 집중적인 HC 방법에 더하여, 시각 검사에 의해, 2개의 BM 샘플이 다른 조건들보다 서로 더욱 유사하였다. 2개의 DF 배양물에 대해서 마찬가지였다. BM 및 DF 샘플 내에 존재하는 다수의 차별적으로 발현된 유전자에도 불구하고, 일반적인 외양은 2개의 BM 및 2개의 DF가 AC/UC 줄기 세포에 대해서보다 서로 더욱 유사하다는 것을 시사하였다. 이는 상기 기술된 HC 결과에 의해 확인되었다.

[0467] 상기 프로세스가 AC-11을 선별된 조건으로 사용하여 적용되었을 때, AC-11 및 UC-11이 다수의 동일한 차별적으로 발현된 유전자를 공유한다는 것이 명백하였지만, 이러한 2개의 조건 사이에 공통적인 유전자의 총수는 AC-03 및 UC-03에 의해 공유된 차별적으로 발현된 유전자의 수보다 적은 것으로 나타났다. 도 12는 AC-03에서 기준선에 비해 6배 이상 차별적으로 과발현된 유전자를 나타낸다. AC-03에서 상향조절된 유전자 대다수는 UC-03에서 또한 상향조절되었고, BM 및 DF에서는 더욱 발산성이었다.

[0468] 6.10.2.4 AC/UC 줄기 세포-특이적 유전자를 확인하는데 사용된 필터링 방법

[0469] 모든 AC/UC 샘플에 걸쳐 일정하게 유지되고, BM 및 DF에서 하향-조절되는 유전자를 AC/UC 줄기 세포-특이적인 것으로 간주하였다. 2가지 필터링 방법을 조합하여 58개의 AC/UC 줄기 세포-특이적 유전자의 목록을 생성하였다 (표 4).

[0471] [표 4]

[0472] 58개의 태반 줄기 세포 또는 제대 줄기 세포-특이적 유전자

기호	유전자	생물학적 프로세스, 기술, 및 추가적인 주석
ACTG2	액틴, 감마 2, 평활근, 장	근육 발달, 세포골격, 제대 동맥 및 전립선 상피에서 발현됨
ADARB1	아데노신 탈아미노효소, RNA-특이적, B1 (RED1 유사체 래트)	RNA 프로세싱, 중추신경계 발달
AMIGO2	암포테린 유도 유전자 2	동종친화성(homophilic) 및 이종친화성(heterophilic) 세포 부착, Ig 유사 도메인 2가 있는 부착 분자
ARTS-1	1형 종양 괴사 인자 수용체 shedding (shedding) 아미노펩티다제 조절인자	단백질분해, 항원 프로세싱, 혈관발생, 태반에서 발현됨
B4GALT6	UDP-Gal; 베타GlcNAc 베타 1,4-갈락토실트랜스페라제, 폴리펩티드 6	탄수화물 신진대사, 막 통합형, 세포간 인식 및/또는 부착에서 기능할 수 있음
BCHE	부티릴콜린에스테라제	콜린에스테라제 활성, 세린 에스테라제 활성, 가수분해효소 활성
C11orf9	염색체 11 오픈 리딩 프레임	가설 단백질, p53-유사 전사 인자, 망막 색소 상피에서 발현됨

[0473]

CD200	CD200 항원	면역글로불린-유사, 표면 단백질, 대식세포를 억제함
COL4A1	콜라겐, 유형 IV, 알파 1	ECM, 기저막, 무섬유 콜라겐, 에레스텐 도메인을 함유함
COL4A2	콜라겐, 유형 IV, 알파 2	ECM, 생체발생, 기저막, COL4A1과 공동발현됨, 형성이상 상피에서 하향조절됨
CPA4	카르복시펩티다제 A4	단백질분해성, 히스톤 아세틸화, 모체 각인, 전립선암 세포주에서 고도로 발현됨
DMD	디스트로핀 (근이영양증, 뒤시엔느(Duchenne) & 베커(Becker) 유형)	근육 수축, 세포 형상 및 세포 크기 제어, 근육 발달
DSC3	테즈모글린 3	동충진화성 세포-세포 부착, 테즈모속에 국소화됨
DSG2	테즈모글린 2	동충진화성 세포-세포 부착, 테즈모속에 국소화됨
ELOVL2	매우 긴 사슬 지방산 (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, 호모)의 신장물-유사 2	지방산 생합성, 지질 생합성
F2RL1	응고 인자 II (트롬빈) 수용체-유사 1	G 단백질-커플링 수용체 단백질 신호전달 경로, 대장 상피 및 뉴런 요소에서 고도로 발현됨
FLJ10781	가설 단백질 FLJ10781	-----
GATA6	GATA 결합 단백질 6	전사 인자, 근육 발달
GPR126	G 단백질-커플링 수용체 126	신호 전달, 신경펩티드 신호전달 경로
GPRC5B	G 단백질-커플링 수용체, 패밀리 C, 그룹 5, 멤버 B	G 단백질-커플링 수용체 단백질 신호전달 경로
ICAM1	세포간 부착 분자 1 (CD54), 인간 리노바이러스 수용체	세포-세포 부착, 세포 부착, 막통과 수용체 활성, 결합 상피에서 고도로 발현됨
IER3	극초기 응답 3	항-세포자멸사, 배아발생 및 형태발생, 세포 성장 및/또는 유지
IGFBP7	인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 7	세포 증식의 음성 조절, 노화 상피 세포에서 과발현됨
IL1A	인터류킨 1, 알파	면역 응답, 신호 전달, 사이토카인 활성, 세포 증식, 분화, 세포자멸사
IL1B	인터류킨 1, 베타	면역 응답, 신호 전달, 사이토카인 활성, 세포 증식, 분화, 세포자멸사
IL6	인터류킨 6 (인터페론, 베타 2)	세포 표면 수용체 연결 신호 전달, 면역 응답

KRT18	케라틴 18	형태발생, 중간 세사, 태반, 태아 및 상피 조직에서 발현됨
KRT8	케라틴 8	세포골격 구성 및 생체발생, 인산화, 중간 세사, KRT18와 공동발현됨
LIPG	리파제, 내피	지질 대사, 지질단백질 리파제 활성, 지질 전달인자, 포스포리파제 활성, 혈관 생물학에 수반됨
LRAP	백혈구-유래 아르기닌 아미노펩티다제	항원 프로세싱, MHC 클래스 I을 통한 내인성 항원; N-말단 아미노펩티다제 활성
MATN2	마트릴린 2	섬유모세포성 또는 상피 기원의 세포주에서 광범위하게 발현됨, 비관절 연골 ECM
MEST	중배엽 특이적 전사 유사체 (마우스)	어버이 각인 유전자, 중배엽 조직의 발달, 태아 조직 및 섬유모세포에서 발현됨
NFE2L3	핵 인자 (적혈구-유래 2) -유사 3	전사 보조인자, 1차 태반 세포영양막에서 고도로 발현되지만, 태반 섬유모세포에서는 그렇지 않음
NUAK1	NUAK 패밀리, SNF1-유사 키나제, 1	단백질 아미노산 인산화, 단백질 세린-트레오닌 키나제 활성
PCDH7	BH-프로토타드레린 (뇌-심장)	세포-세포 부착 및 인식, 7 카드헤린 반복부를 함유함
PDLIM3	PDZ 및 LIM 도메인 3	알파-액티닌-2-회합 LIM 단백질, 세포골격 단백질 결합, 골격근에서 발현됨
PKP2	플라코필린 2	세포-세포 부착, 테즈모속에 국소화됨, 상피에서 발견됨, 카드헤린 및 중간 세사에 결합함
RTN1	레티쿨론 1	신호 전달, 뉴런 분화, 신경내분비성 분비, 신경내분비 세포에서의 막 트래피킹(trafficking)
SERPINB9	세르핀 펩티다제 억제제, 시아드 B (오브알부민), 멤버 9	세린 프로테아제 억제제, 응고, 섬유소용해, 보체 고정, 매트릭스 리모델링, 태반에서 발현됨
ST3GAL6	시알릴트랜스퍼라제 10	아미노 당 대사, 단백질 아미노산 글리코실화, 당지질 대사, 단백질-리포일화
ST6GALNAC5	시알릴트랜스퍼라제 7E	단백질 아미노산 글리코실화, 강글리오사이드 생합성
SLC2A8	용질 캐리어 패밀리 12 (나트륨/칼륨/클로라이드 운반인자), 멤버 8	아미노산-폴리아민 전달인자 활성, 양이온-클로라이드 공동전달인자 9, 상피 면역에서의 가능한 역할 (건선)

TCF21	전사 인자 21	전사 조절, 중간엽 발달, 신장의 상피 세포에서 발견됨
TGFB2	전환 성장 인자, 베타 2	세포 사이클의 조절, 신호 전달, 세포-세포 신호전달, 세포 증식, 세포 성장
VTN	비트로넥틴 (혈청 확산 인자, 소마토메딘 B, 보체 S-단백질)	면역 응답, 세포 부착, 분비형 단백질, ECM에 결합함
ZC3H12A	아연 손가락 CCCM-유형 함유 12A	MCP-I 처리-유도 단백질, 핵산 결합, 가설 아연 손가락 단백질

[0476]

[0477]

모든 BM 및 DF 샘플과 비교하여 8개의 AC/UC 줄기 세포 조건 중 7개 이상에서 ≥ 3 배 과발현된 유전자들을 선별함으로써 58개의 유전자를 확인하였다 (도 13). 8개의 AC/UC 줄기 세포 조건 중 8개 상에서의 필터링으로 유사한 목록이 산출되었다. 두번째 필터링 방법은 Affymetrix MAS 5.0 소프트웨어가 제공하는 "부재" 및 "존재" 신호(call)를 사용하였다. 모든 BM 및 DF 조건에서 부재하고 AC-03, AC-11, UC-03, 및 UC-11에 존재하는 유전자를 확인함으로써 목록이 생성되었다. 후속의 AC/UC 줄기 세포 조건에서의 유전자 신호는 명기되지 않았다.

[0478]

2개의 목록이 현저히 중첩되었고, 조합되었다. 조합된 목록을 (1) 대부분의 또는 모든 AC/UC 줄기 세포 조건에서 매우 낮은 수준으로 발현된 여러 유전자, 및 (2) Y 염색체가 보유하는 유전자를 삭제함으로써 추가로 정리하였다. 이러한 연구에서 사용된 AC 및 UC 세포는 FISH 분석에 의해 남성 세포인 것으로 확인되었고, BM 및 DF는 여성 기증자로부터 유래되었다. 생성된 46개의 AC/UC 줄기 세포-특이적 유전자의 목록이 표 5에서 제시된다.

[0479]

[표 5]

온톨로지(ontology)에 의해 열거된 AC/UC-특이적 유전자				
세포 부착	세포골격	발달	ECM	상피에 관련됨
AMIGO2	ACTG2	ADARB1	COL4A1	ACTG2
B4GALT6	DMD	IER3	COL4A2	C11orf9
DSC3	KRT18	IGFBP7	MATN2	COL4A1
DSG2	KRT8	IL1A	VTN	COL4A2
ICAM1	PDLIM3	IL1B		DSC3
PCDH7		MEST		DSG2
PKP2		TGFB2		F2RL1
VTN				ICAM1
글리코실화	면역 응답	단백질분해	신호전달	IGFBP7
B4GALT6	ARTS-1	ARTS-1	F2RL1	IL6
ST3GAL6	CD200	CPA4	GPR126	KRT18
ST6GALNAC5	IL1A	LRAP	GPRC5B	KRT8
전사	IL1B		IL1A	MATN2
C11orf9?	IL6		IL1B	PKP2
GATA6	LRAP		IL6	SLC12A8
NFE2L3	SLC12A8		RTN1	TCF21
TCF21	VTN		TGFB2	

[0480]

[0481]

46개의 유전자의 이러한 목록은 다수의 온톨로지 군을 나타내는 단백질들의 수집물을 코딩한다. 가장 고도로 표현된 군인 세포 부착 군은 8개의 유전자를 함유한다. DNA 복제 또는 세포 분할에 수반되는 단백질을 코딩하는 유전자는 없다. 상피에 대해 특히 관련된 16개의 유전자가 또한 열거된다.

[0482]

6.10.3 토론

[0483]

태반 줄기 세포에 특이적이고 골수-유래 중간엽 세포와 구별가능한 발현 패턴이 확인되었다. 조작상, 이러한 패턴은 모든 BM 및 DF 샘플에 비해 모든 태반 줄기 세포 샘플에서 과발현된 46개의 유전자를 포함한다.

[0484]

실험 디자인에서 단기, 중기 및 장기 배양 시간 동안 배양된 샘플들이 비교되었다. AC 및 UC 세포에 대해, 각각의 배양 기간에는 차별적으로 발현된 유전자들의 특징적인 세트가 있다. 단기 또는 초기 단계 (AC-03 및 UC-03) 동안, 200개의 상향 조절된 유전자들이 8회의 개체수 배가 후 평균으로 돌아간다. 이론에 제한되지 않고, 이러한 초기 단계 유전자 발현 패턴은 천연 태반 환경 내에 있는 동안의 AC 및 UC의 발현 패턴과 유사할 것이다. 태반에서, 이러한 세포들은 활발하게 분열하지 않고, 이들은 영양소를 신진대사하고, 서로 간에 신호

를 전달하며, 세포의 주위환경을 리모델링함으로써 이들의 위치를 확실하게 한다.

[0485] 중기 배양에 의한 유전자 발현은 급속한 세포 분열로 정의되고, 이러한 시간에 차별적으로 발현된 유전자들은 초기 단계 동안 차별적으로 발현된 것들과 꽤 상이하다. BM-03 및 DF-14와 함께, AC-11 및 UC-11에서 상향 조절된 유전자들 중 다수는 염색체 복제 및 세포 분열에서 수반된다. 유전자 발현을 기초로, BM-03은 생물학적으로 중기 배양물인 것으로 보인다. 이러한 중간 단계에서, 세포 유형-특이적 유전자 발현은 세포 증식에 의해 무색해진다. 또한, 단기 AC 또는 UC 배양물에서 과발현된 대부분의 모든 유전자가 중기 및 후기 단계 조건에서 하향 조절된다. 이러한 고도로 증식성인 단계 동안 143개의 유전자가 ≥ 5 배 상향되었고, 발현된 유전자의 약 1.7%를 구성하였다.

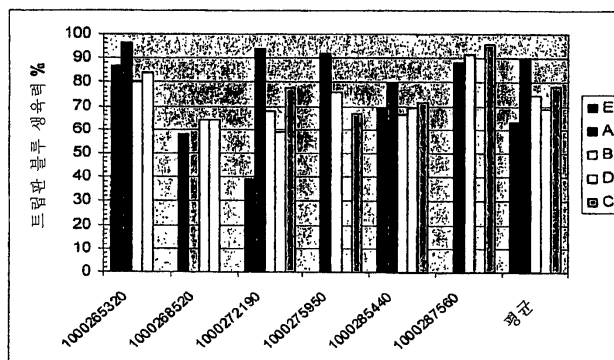
[0486] 장기 배양물은 최종 또는 노화 단계를 나타낸다. 이러한 단계에서, 세포의 분할 능력이 고갈되고, 특히 AC 및 UC에 대해, 차별적으로 분화된 유전자의 절대값이 현저하게 감소된다. 이는 세포가 배양 환경에 완전히 적응한 것 및 결과적으로 감소된 생합성 부담의 결과일 수 있다. 놀랍게도, 후기 BM 및 DF 배양물은 이러한 거동을 디스플레이하지 않는다; 다수의 유전자가 AC 및 UC 및 표준화된 값 1에 비해 BM-11 및 DF-24에서 차별적으로 발현된다. AC 및 UC는 장기 배양물에서 대부분 현저하게 BM 및 DF로부터 구별가능하다.

[0487] 본원에 기술된 태반 줄기 세포-특이적 유전자 목록은 다양하다. COL4A1 및 COL4A2는 동등하게 조절되고, KRT18 및 KRT8 또한 공동-발현되는 것으로 보인다. 유전자들 중 8개가 세포 대 세포 접촉에 수반되는 단백질을 코딩하고, 이들 중 3개 (DSC3, DSG2, 및 PKP2)는 케라틴 18 및 케라틴 8과 같은 중간 세사 세포골격에 고정된 세포가 접촉점인 테즈모솜(desmosome)에 국소화된다. 단단한 세포-대-세포 접촉은 상피 및 내피 세포의 특징이고, 전형적으로 섬유모세포와 관련되지 않는다. 표 3에 상피 세포에 특징적인, 총 46개 중 16개의 유전자가 열거된다. 태반 줄기 세포는 섬유모세포-유사 소형 방추-형상 세포로 일반적으로 기술된다. 이러한 형태학은, 특히 더 낮은 세포 밀도에서, BM 및 DF과 전형적으로 상이하다. CD200의 발현 패턴이 또한 주지되는데, 이는 AC/UC 줄기 세포에는 존재하고 모든 BM 및 DF 샘플에는 부재한다. 또한, CD200은 태아 발달 동안 태반에서의 면역 내성과 관련되는 것으로 나타났다 (예를 들어, [Clark et al., Am. J. Reprod. Immunol. 50(3):1 87-195 (2003)] 참조).

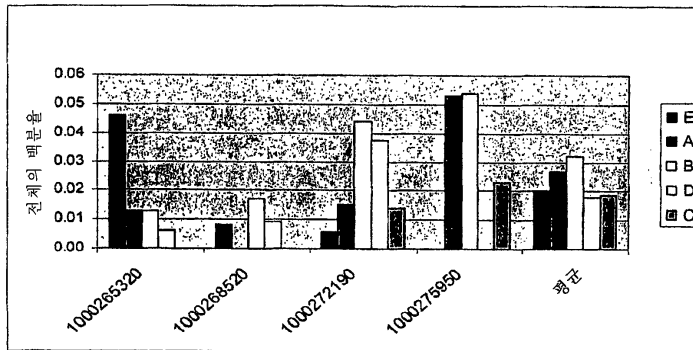
[0488] 46개의 유전자의 이러한 유전자 부분집합은 AC/UC 줄기 세포를 골수-유래 중간엽 줄기 세포 또는 섬유모세포로부터 구별하는 분자 생체마커(biomarker)의 셋트를 구성한다.

도면

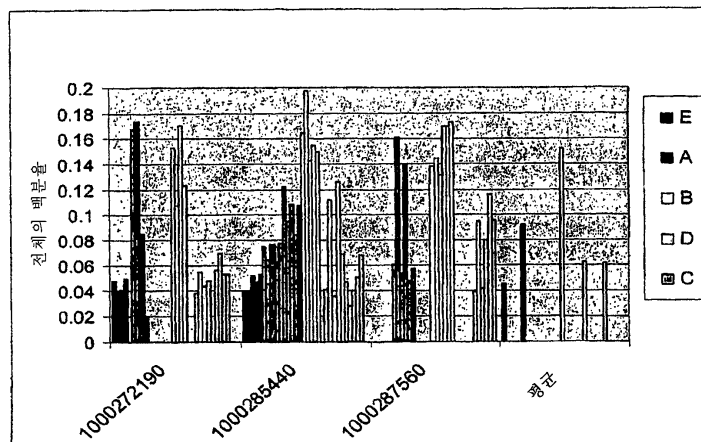
도면1



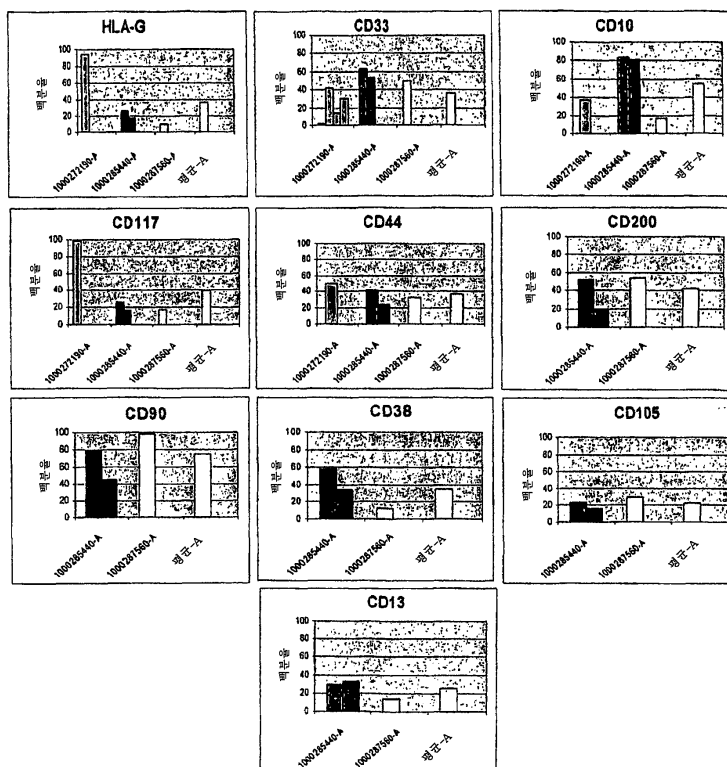
도면2



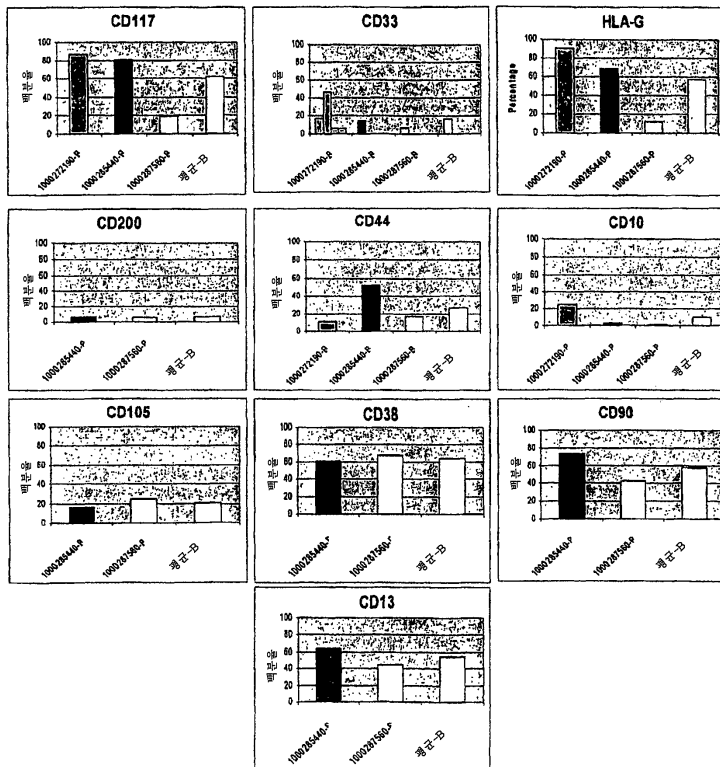
도면3



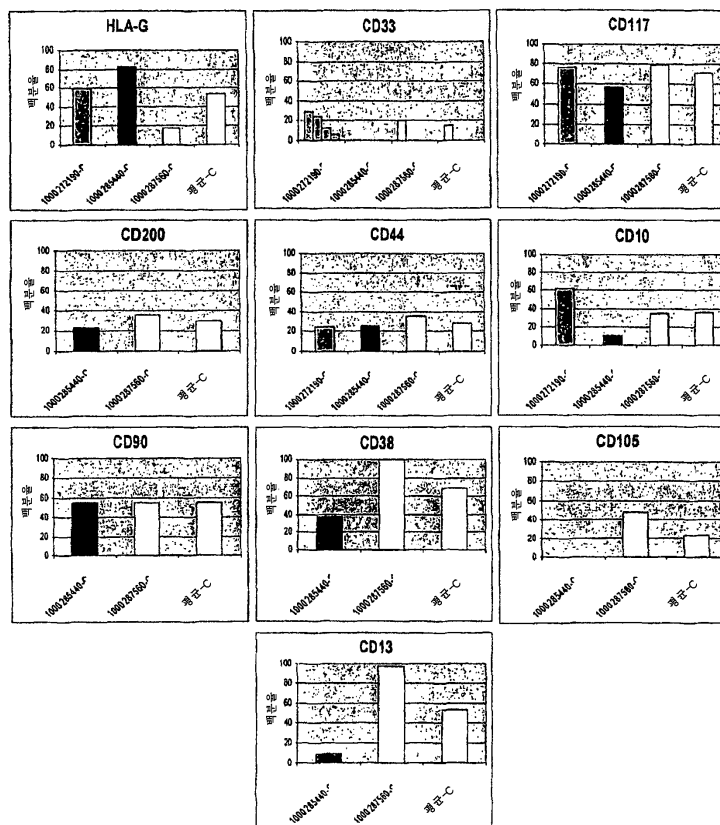
도면4



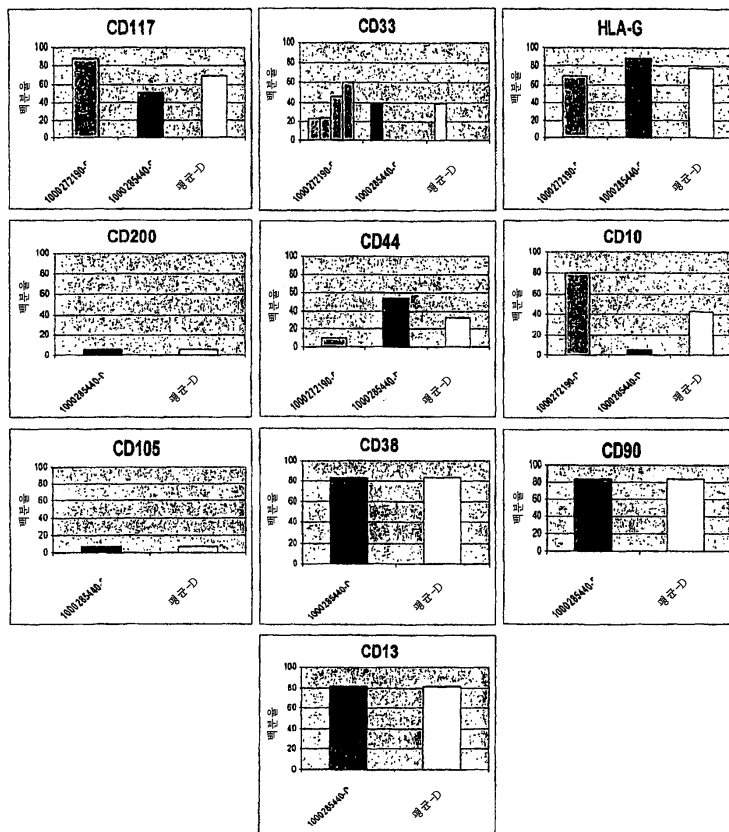
도면5



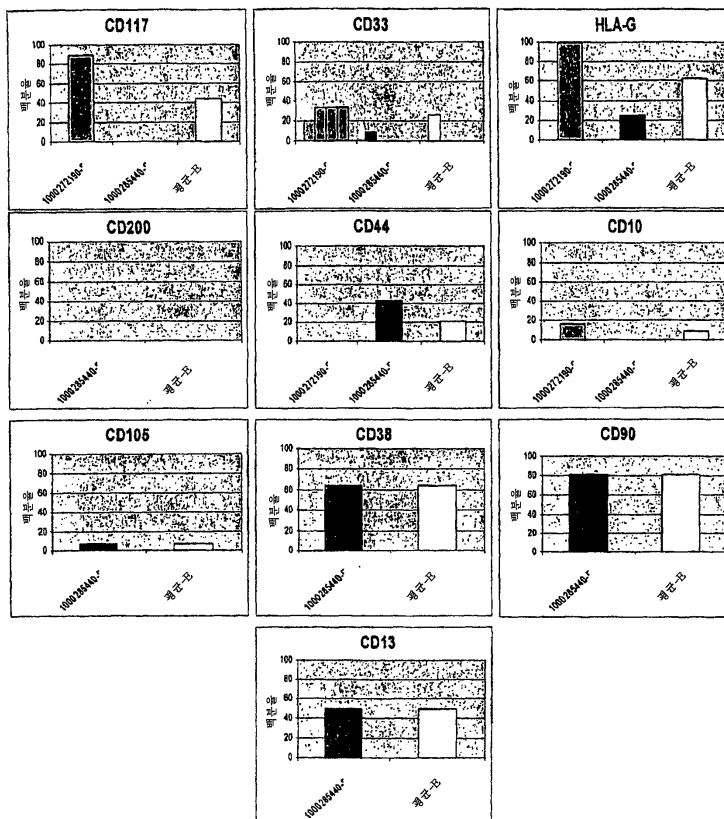
도면6



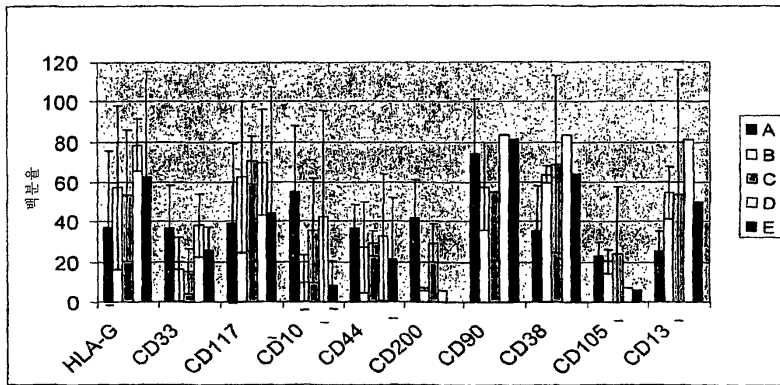
도면7



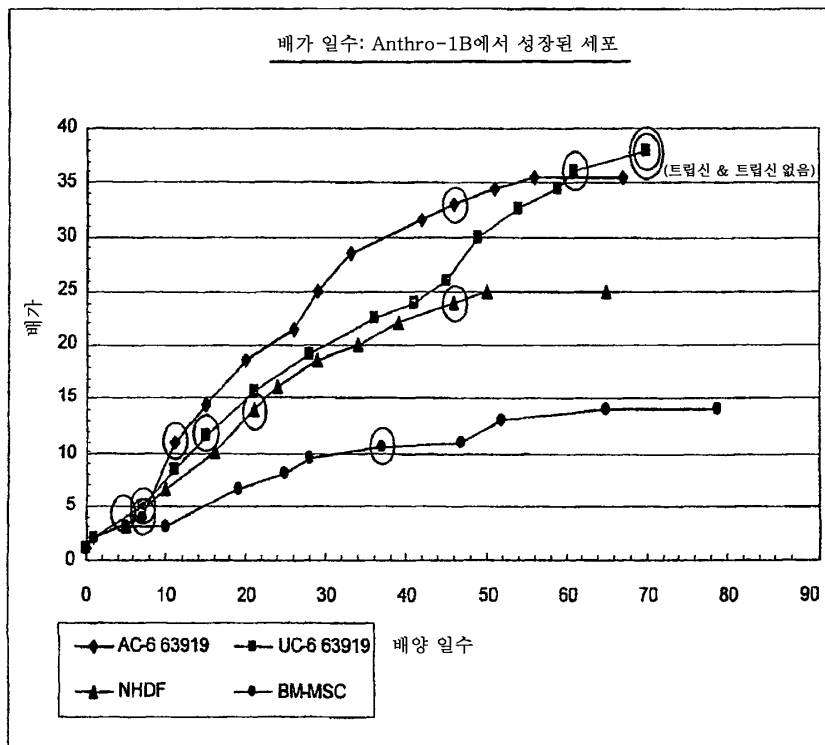
도면8



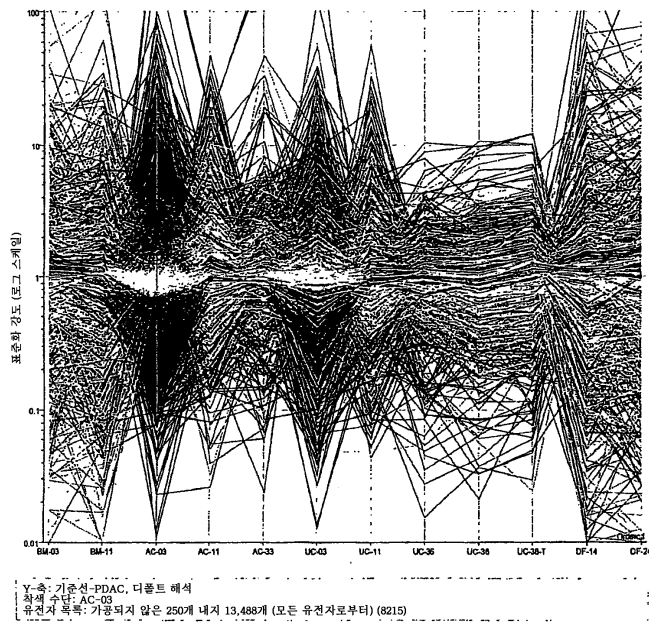
도면9



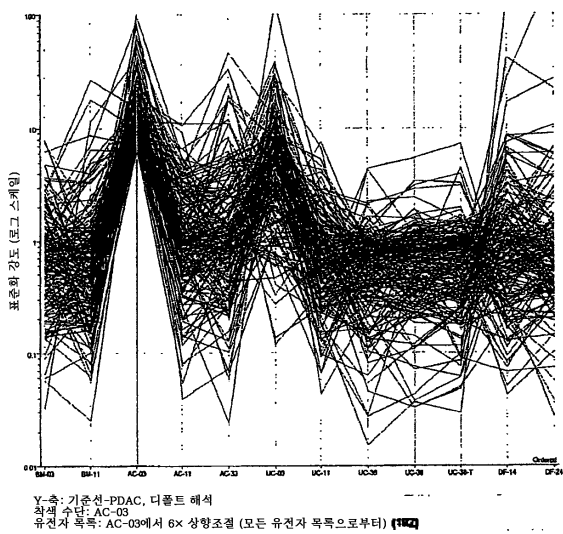
도면10



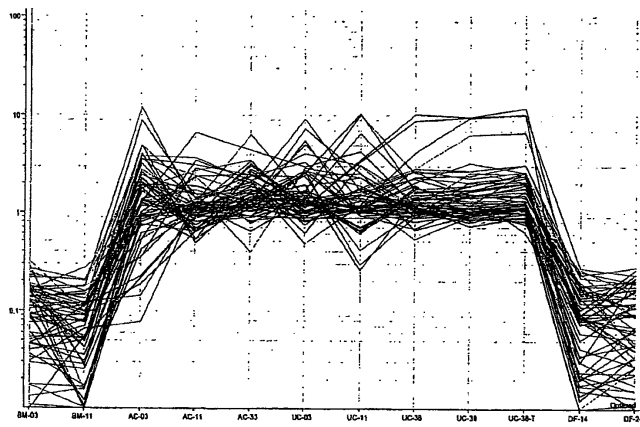
도면11



도면12



도면13



Y-축: 기준선-PDAC, 더플트 해석
 좌측 수단: BM-03
 유전자 목록: 3×BM 및 DF, PDAC보다 낮음 (58)