



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0056302
(43) 공개일자 2008년06월20일

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7011437

(22) 출원일자 2008년05월13일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년05월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/040145

국제출원일자 2006년10월13일

(87) 국제공개번호 WO 2007/047465

국제공개일자 2007년04월26일

(30) 우선권주장

60/727,601 2005년10월13일 미국(US)

(71) 출원인

안트로제네시스 코포레이션

미국 뉴저지주 07927 세다 놀스 호스피탈 로드 45

(72) 발명자

헤이다란, 모하메드

미국, 뉴저지 07928, 차탐, 88 오르몬트 로드

(74) 대리인

특허법인필앤은지

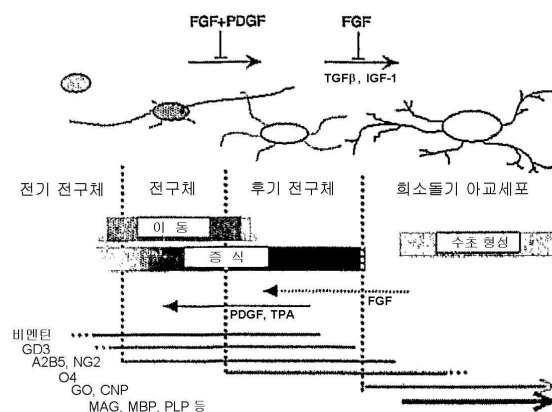
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 태반 유래 줄기세포로부터 생산된 희소돌기 아교세포

(57) 요약

본 발명은 신경 아교세포와 희소돌기 아교세포를 태반 줄기세포로부터 생산하는 방법과 이를 위한 조성물을 제공한다. 본 발명은 나아가, 이들 신경 아교세포와 희소돌기 아교세포를 예를 들어 외상, 허혈증과 중추신경계의 퇴행성 질환의 치료와 시술, 특히 다발경화증 같은 탈수초성 질환의 치료에 사용하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

태반 유래 줄기세포가 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte)의 특성을 나타내기에 충분한 조건과 시간 속에서 상기 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는, 희소돌기 아교세포의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 특성은 미엘린 희소돌기 아교세포 특이적 단백질(myelin oligodendrocyte specific protein)의 생산 또는 미엘린 희소돌기 아교세포 특이적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현인 것을 특징으로 하는 희소돌기 아교세포의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양은 상기 줄기세포를 이소부틸메틸크산틴(isobutylmethylxanthine, IBMX)과 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 희소돌기 아교세포의 제조 방법.

청구항 4

제1항의 방법에 따라서 제조된 희소돌기 아교세포.

청구항 5

제4항의 희소돌기 아교세포를 수초(髓鞘)형성(myelination) 이상과 연관된 질병, 질환 또는 상태를 가지는 대상에게 도입하는 단계를 포함하는,

수초 형성 이상 관련 질환의 치료 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 질병, 질환 또는 상태는 다발성 경화증인 것을 특징으로 하는, 수초 형성 이상 관련 질환의 치료 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 태반 유래 줄기세포(이하 PDSC(placent-derived stem cell)로 약칭)로부터 아교세포(阿膠細胞 glial cell)와 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte)를 생산하는 방법과 그를 위한 조성물을 제공한다. 본 발명은 나아가 이들 아교세포와 희소돌기 아교세포를 예를 들어 외상, 허혈(ischemia)과 중추 신경계 퇴행성 질환의 치료와 시술에 이용하는 방법을 제공한다.

배경기술

- <2> 중추신경계 신경교(神經膠 glia)를 발생할 수 있는 배아 줄기세포는 척수 외상 후의 기능 회복을 도울 수 있고, 다발성 경화증과 같은 탈수초성(demyelinating) 또는 미엘린 이상 형성(dysmyelinating) 질환의 치료에 쓰일 수 있는 가능성을 지닌다. 그러나 임상 치료를 위하여 배아 줄기세포를 이용하는 것은 쉽게 해결하기 어려운 윤리적 문제를 불러온다.
- <3> 체세포 줄기세포를 치료에 응용하자는 제안 역시 나온 바 있다. 예를 들어 세포 보충 요법(cell replenishment therapy)의 동물 모형에서 그러하다. 이식된 줄기세포의 치료 역량은 윤리적으로 인정되는 자가 줄기세포원이 존재하고, 줄기세포가 특정 세포 유형으로 성숙하는 것을 제어하는 자가 재생(self renewal)과 세포 운명 결정(fate decision)을 조절할 수 있을 때만 임상 이용으로 실현될 수 있다.
- <4> 신경 퇴행성 질환은 점점 더 이환률과 사망률에 있어서 중요한 몫을 차지하고 있다. 미엘린의 파괴는 젊은 성

인에 있어서 가장 흔한 신경계 질환인 다발성 경화증의 기초가 되며, 미엘린은 파괴된 뉴런의 축삭(axon)의 재생을 막고 파괴되지 않은 근위부 축삭(proximal axon)의 전기 전도에 영향을 미쳐 외상성 척수 손상(traumatic spinal cord injury) 후 회복에 영향을 준다. 회소돌기 아교세포의 교체는 따라서 중요한 임상 목표이다. 회소돌기 아교세포는 신경 줄기세포로부터 얻을 수 있지만, 이 줄기세포는 얻기 어렵다.

발명의 상세한 설명

<5> 발명의 요약

<6> 본 발명은 태반 유래 줄기세포로부터 회소돌기 아교세포를 생산하는 방법과 그를 위한 조성물, 그리고 이러한 회소돌기 아교세포를 이용하여 외상, 허혈 또는 중추신경계의 전신 장애에 관련된 질환, 질병 또는 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 한 측면에서는 태반 유래 줄기세포로부터 얻은 회소돌기 아교세포를 이용하여 비정상적 수초(髓鞘)형성(myelination)과 관련된 질병, 질환 또는 상태를 치료하는 방법과 연관된다. 본 발명의 한 실시 태양에서는 회소돌기 아교세포의 특성을 발현하기에 충분한 시간과 조건 하에서 태반 유래 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 회소돌기 아교세포의 제조 방법을 제공한다. 한 구체적인 실시 태양에서는, 상기 특성이 미엘린 회소돌기 아교세포 특이적 단백질의 생산 또는 미엘린 회소돌기 아교세포 특이적 단백질을 암호화하는 유전자의 발현이다. 다른 구체적 실시 태양에서 상기 배양은 상기 줄기세포를 이소부틸메틸크산틴(isobutylmethylxanthine, IBMX)과 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 다른 실시 태양에서는 태반 유래 줄기세포의 분화에 의하여 생산한 회소돌기 아교세포를 제공한다. 본 발명은 또한 비정상적 수초 형성과 관련된 질병, 질환 또는 상태를 가지는 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 환자에게 이러한 회소돌기 아교세포를 투여하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 질병, 질환 또는 상태가 다발성 경화증이다.

<7> 1. 회소돌기 아교세포의 생산

<8> 본 발명은 태반 유래 세포, 특히 태반 줄기세포로부터 회소돌기 아교세포를 생산하는 방법과 그를 위한 조성물을 제공하는데, 이들 세포는 태반 유래 줄기세포(placent-derived stem cell, PDSC)로도 불린다. 줄기세포는 포유류 태반을 관류(Hariri의 미국 특허 출원 공보 제2002/0123141호와 2003/0032179호, 전체 내용이 본 발명의 참고 문헌)하여 얻을 수 있다. 줄기세포는 또한 태반 또는 그 일부분의 파괴(예를 들어 냉침법(冷浸法 maceration). 실시예 2장을 보라)에 의하여 태반으로부터 얻을 수 있다. 회소돌기 아교세포의 특성을 나타내는 세포는 태반 유래 줄기세포로부터 얻을 수 있다. 이들 세포는 예를 들어 다발성 경화증과 같은 탈수초화(demyelination) 또는 미엘린 이상 형성(dysmyelination) 질환과 관련된 질병, 질환 또는 상태를 치료하는데 유용하다.

<9> 본 발명의 한 실시 태양에서는 아래와 같은 방법으로 태반에서 분화가능한 세포, 예를 들어 줄기세포를 얻을 수 있다. 단핵세포(MNC)의 1차 배양물을 태반, 예를 들어 사람 태반의 관류물로부터 분리한다. 이러한 태반은 충분히 고지받은 산모의 완전한 동의 하에서 만기 임신으로 출산한 신생아의 탄생 후 얻게 된다. 간략하게, 탯줄 혈관에 흐름 조절 회로에 연결된 카놀라를 삽관하고 이 태반을 예를 들어 분당 1 mL의 속도(실온, 최장 24시간)로 고농도 포도당, 1% 해파린과 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM, Gibco/BRL사)로 관류한다. 이어서 태반 관류물(750 mL)을 모으고, 원심분리한 다음, 세포 펠렛을 1% 소 태아 혈청(FBS) 함유 PBS에 재현탁하고, Lymphoprep(Gibco/BRL사의 상표)을 이용한 분별 밀도구배 원심분리(differential density gradient centrifugation)로 분리한다. 부착 PDSC를 포함한 단핵세포를 함유하는 백혈구 연층(軟層 buffy coat) 계면을 회수한 다음, DMEM/10% FBS에 재현탁하고, 피프로넥틴 피복 Falcon 플레이트(Sigma사) 표면에 발라주어 37°C, 5% 가습 이산화탄소하에서 배양한다. 24시간 배양 후, 비부착세포를 버린 다음, 부착세포를 신선한 배양 배지 속에서 유지하고 증폭(expansion)한다. 개별 세포 콜로니는 10 내지 18일 안에 형성되며, PDSC 세포주로 증폭하게 된다.

<10> 사람 태반 유래 줄기세포는 배양시 섬유모세포(fibroblast) 유사 형태를 나타내며(도 2a), HLA 클래스 I에 대하여 양성이다. 이들 세포를 FACS 분석하면 이들 세포는 조혈 표지 CD34 또는 CD45를 나타내지 않는다. 그러나 이들 세포는 중복능성(multipotential) 세포 표면 표지인 CD10(CALLA), CD29(β_1 인테그린), CD54(ICAM-1), CD90(Thy-1)과 SH2, SH3을 발현한다. 표준적인 성장 조건에서 PDSC의 배증 시간은 18 내지 36 시간이며, 이들 세포는 이러한 표현형을 시험관내에서 세포군 배증이 40회 이상 되기까지 유지한다.

<11> 태아, 조혈, 골수 버팀질 세포(stromal cell)를 포함하는 줄기세포의 시험관내와 생체내 신경 분화에 대해서는 수많은 연구가 있다(Glaser 외, FASEB J. 2005 19(1):112-4 (2005); Rogister 외, Cellular Neuroscience

14:287-300 (1999); Rao와 3MayerProschel, Dev. Biol. 188:48-63 (1997); Anderson, Neuron 30:19-35 (2001); Rao, Stem Cells and Development 13:452-455 (2004); Hermanson 외, Nature 419:934-939 (2002); Johe 외, Genes Dev. 10:3129-3140(1996)).

<12> 시험관내 신경 분화는 세포내 cAMP 농도를 높이는 시약을 이용하여 촉진할 수 있다. 사람 태반 유래 세포가 신경 세포계통을 발생할 수 있는지 살펴보기 위하여, 시험관 내에서 이들을 비슷한 환경 속에서 배양하였다. PDSC 단일층을 수확하고(0.25% 트립신, 1 mM EDTA) 0.5 mM IBMX(Sigma사)를 함유하는 배양 배지 위에 발라 주었다(5×10^3 세포/mL). 그리고 24~72시간 동안 형태 변화를 위상차 현미경과 면역 형광법, 흐름 세포 측정법을 이용하여 관찰하였다. 배양 3일 후 약 50%의 세포가 긴 돌기와 두드러진 구형의 세포체(cell soma)를 가지는 신경 세포 유사 형태였는데, 대조군 배양 세포에서는 분화가 일어나지 않았다. IBMX 처리 배양 세포도 많은 신경내피 세포 계통 표지에 대한 면역원성을 나타내었는데, 이 표지에는 신경 전구세포 표지(네스틴(nestin), 비멘틴(vimentin), GFAP), 신경세포 표지(에놀라제, 신경섬유(neurofilament))와 아교세포 표지(MOSP)를 나타내는 세포가 포함된다(도 2). 신경 항원 발현의 시간에 따른 양상을 밝히기 위하여 처리 PDSC와 미처리 PDSC 양쪽에 대하여 흐름 세포 측정을 실시하였다. 배양 하루 뒤에 IBMX 처리한 모든 표지에 대해서는 항원 발현의 변화가 뚜렷했지만, 미처리 세포에서는 변화가 없었다. 따라서 이러한 유도 조건하에서 관측된 변화는 항원성 표지를 신속하게 획득하는 것을 나타내며, 이는 선택적인 세포 농축 또는 생존보다는 신경 분화에 더 부합한다.

<13> 태반 유래 줄기세포는 IBMX, 신경 줄기세포 성숙 인자(EGF, FGF 등) 및/또는 희소돌기 아교세포 전구세포 분열 촉진 물질(mitogen, FGF나 PDGF 등)을 포함하는 배양 배지 속에서 배양하면 희소돌기 아교세포로 분화할 수 있다. 희소돌기 아교세포는 앞서 기술한 대로 태반 유래 줄기세포로부터 얻을 수 있고, 실시예 1장에 기술하는 대로 유지하고 배양할 수 있다. 희소돌기 아교세포의 분화는 실시예 3장에서 기술하는 면역조직화화법과 중합 효소 연쇄반응과 실시예 5장에서 기술하는 흐름 세포측정법에 따라 평가할 수 있다. 희소돌기 아교세포 증식, 이동과 생존은 실시예 4장에서 기술하는 바에 따라 평가할 수 있다.

<14> 2. 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군

<15> 본 발명의 면역 억제법은 태반 줄기세포를 이용한다. 즉 태반 혹은 그 일부로부터 얻을 수 있는 줄기세포로서 (1) 조직 배양 기질에 부착하고, (2) 비태반 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖추고 있으며, (3) 충분한 수일 때, $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 줄기세포가 림프구 혼합 배양 반응에서 증식하는 것 등의 면역 기능을 측정 가능한 정도로 억제하는 능력을 가지는 줄기세포이다. 태반 줄기세포는 태반 혈액 또는 제대혈 등의 혈액에서 유래하지 않는다. 본 발명의 방법과 조성물에서 쓰이는 태반 줄기세포는 개체의 면역계를 억제하는 능력을 갖추고 있으며, 이러한 능력을 가지는 세포가 선택된다.

<16> 태반 줄기세포는 태아 또는 모체에서 유래한 것(즉 태아 아니면 모체의 유전형을 띠 수 있음)이다. 태반 줄기 세포군 또는 태반 줄기세포를 함유하는 세포군은 오로지 태아 유래 또는 오로지 모체 유래인 태반 줄기세포를 포함할 수 있고, 또 태아와 모체 유래가 섞인 혼합 태반 줄기세포군을 포함할 수도 있다. 상기 태반 줄기세포와 태반 줄기세포를 함유하는 태반 줄기세포군은 아래에 기술하는 형태학적 표지와 배양 특성에 따라 동정되고 선택될 수 있다.

<17> 2.1 물리적·형태학적 특성

<18> 본 발명에서 사용되는 태반 줄기세포는 1차 배양되거나 세포 배양되었을 때조직 배양 기질, 예를 들어 조직 배양 용기의 표면(조직 배양용 플라스틱 등)에 부착한다. 배양 중인 태반 줄기세포는 일반적으로 섬유모세포 형상이며 별 모양이고 세포체의 중심에서 세포질 돌기가 몇 군데 볼거져 나온다. 이 태반 줄기세포는 그러나 같은 조건하에서 배양된 섬유 모세포와 형태학적으로 구별이 가능한데, 태반 줄기세포는 섬유모세포보다 그러한 돌기를 더 많이 나타내기 때문이다. 형태학적으로 태반 줄기세포는 조혈 줄기세포와도 구별할 수 있는데, 조혈 줄기세포는 배양시 더 둥글거나 조약돌 모양을 나타낸다.

<19> 2.2 세포 표면, 분자 표지와 유전적 표지

<20> 본 발명의 방법과 조성물에 유용한 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군은 상기 줄기세포 또는 이 줄기세포를 함유하는 세포군의 동정 및/또는 분리에 쓰일 수 있는 표지를 여러 개 발현한다. 이 태반 줄기세포와 본 발명의 줄기세포군(즉 둘 이상의 태반 줄기세포)은 태반으로부터 직접 얻거나 태반의 어느 일부분(예를 들어 양막, 융모막, 태반의 태반엽 등)에서 얻은 줄기세포와 줄기세포 함유 세포군을 포함한다. 태반 줄기세포군은 또한 배양

중인 태반 줄기세포와 백과 같은 용기 안에 든 세포의 군(즉 둘 이상의 태반 줄기세포)을 포함한다. 태반 줄기 세포는 하지만 영양막 세포가 아니다.

<21> 태반 줄기세포는 일반적으로 CD73, CD105, CD200, HLA-G 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38 또는 CD45를 발현하지 않는다. 태반 줄기세포는 또한 HLA-ABC(MHC-1)와 HLA-DR을 발현한다. 이들 표지는 태반 줄기세포를 동정하고 태반 줄기세포를 다른 줄기세포로부터 구별하는데 쓰인다. 상기 태반 줄기세포가 CD73과 CD105를 발현할 수 있기 때문에, 이들은 중간엽 줄기세포와 유사한 특성을 지닐 수 있다. 그러나 이 태반 줄기세포는 태아 특이적 표지인 CD200과 HLA-G를 발현할 수 있기 때문에 중간엽 줄기세포, 예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포와 같이 CD200과 HLA-G를 발현하지 않는 것들과는 구별할 수 있다. 마찬가지로 방식으로 CD34, CD38 및/또는 CD45의 미발현으로부터 이 태반 줄기세포가 비조혈 줄기세포임을 알 수 있다.

<22> 한 실시 태양에서 본 발명은 CD200⁺, HLA-G⁺인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 상기 복수의 태반 줄기세포는 MLR 분석에서 T 세포 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 분리된 세포군에 관한 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 또한 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 실시 태양에서 상기 분리된 세포군은 배아유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때, 하나 이상의 배아유사체를 발생한다.

<23> 본 발명 방법의 다른 실시 태양에서는 CD73⁺, CD105⁺와 CD200⁺인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 상기 복수의 줄기세포는 MLR에서 T 세포의 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 상기 세포군의 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 또한 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 더욱 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻이고 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 세포군은 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성한다.

<24> 본 발명은 또한 CD200⁺이고 OCT-4⁺인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 MLR에서 T 세포의 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 세포군은 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성한다.

<25> 본 발명은 또한 CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 MLR에서 T 세포의 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 OCT-4⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD200⁺이다. 다른 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺이고 CD200⁺이다.

<26> 본 발명은 또한 CD73⁺, CD105⁺인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성하고, MLR에서 T 세포의 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 OCT-4⁺이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다.

<27> 본 발명은 또한 OCT-4⁺인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상

기 복수의 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성하고, MLR에서 T 세포의 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 다양한 실시 태양에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 상기 분리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 줄기세포이다. 상기 세포군의 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD200⁺이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 세포군은 증폭된 것, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 절도 다섯 차례, 적어도 열 차례, 절어도 열다섯 차례, 적어도 스무 차례 계대(passage)된 것이다.

<28> 다른 실시 태양에서 본 발명은 CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻이고 CD133⁻인 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공한다.

<29> 상술한 태반 줄기세포의 한 구체적 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 IL-6, IL-8과 단핵구 화학주성 단백질(MCP-1)을 구성적으로(constitutively) 분비한다.

<30> 각각의 상기 언급한 복수의 태반 줄기세포는 포유류 태반에서 직접 분리하여 얻은 태반 줄기세포 또는 배양되고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 또는 그 이상 계대되고 배양된 태반 줄기세포 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

<31> 상술한 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포는 적어도 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 이보다 많은 수의 태반 줄기세포를 함유하거나, 적어도 이 정도의 줄기세포를 함유하거나, 혹은 이 정도 수 이하의 줄기세포를 함유한다.

<32> 2.3 태반 줄기세포군의 선별과 제조

<33> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 세포군의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 줄기세포인 태반 세포군을 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 T 세포 증식을 MLR 분석에서 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 CD73⁺이면서 CD105⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성하는 복수의 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<34> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 T 세포 증식을 MLR 분석에서 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻이고 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성하는 태반 세포군을 선별하는 것을 더 포함한다.

<35> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD200⁺, OCT-4⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함

하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 T 세포 증식을 MLR 분석에서 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 이고 $CD45^{-}$ 인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 이고 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<36> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, HLA-G⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 T 세포 증식을 MLR 분석에서 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 이고 $CD45^{-}$ 인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 $CD200^{+}$ 인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, OCT-4⁺이고 $CD200^{+}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<37> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 태반 세포는 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 이고 $CD45^{-}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 OCT-4⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 OCT-4⁺, $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<38> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 면역 억제성 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 OCT-4⁺인 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 태반 세포는 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD73^{+}$ 이고 $CD105^{+}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 $CD200^{+}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$, $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$ 인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<39> 본 발명은 또한 면역 억제성인 세포군 또는 복수의 태반 줄기 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 앞서 설명한 복수의 태반 줄기세포 중 아무 것이라도 선별하는 단계, 상기 복수의 태반 줄기세포를 다른 세포, 예를 들어 다른 태반 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다. 특정 실시 태양에서, 본 발명은 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 세포를 선별하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 태반 세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하며, (b) $CD200$ 과 HLA-G를 발현하거나, $CD73$, $CD105$ 와 $CD200$ 을 발현하거나, $CD200$ 과 OCT-4를 발현하거나 $CD73$, $CD105$ 와 HLA-G를 발현하거나 혹은 $CD73$ 과 $CD105$ 를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나,

<40> OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하며, (c) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식

을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제한다. 이 방법은 또한 상기 태반 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다.

<41> 더 구체적인 실시 태양에서 본 발명은 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하고, 이때 이 태반 줄기세포는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 HLA-G를 발현하고 (c) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제한다. 이 방법은 또한 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 구체적 실시 태양에서 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하고 (c) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 OCT-4를 발현하고 (c) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73과 CD105를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 HLA-G를 발현하고 (c) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 (a) 기질에 부착하면서 (b) OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다.

<42> 면역 억제성 태반 줄기세포군을 제조하는 방법의 한 특정 실시 태양에서, 상기 T 세포와 상기 태반 세포는 상기 MLR 속에서 약 5:1의 비율로 포함되어 있다. 이 방법에 사용되는 상기 태반 세포는 온전한 태반으로부터 유래하거나, 혹은 주로 양막, 또는 양막과 융모막으로부터 유래할 수 있다. 다른 특정 실시 태양에서, 이 태반 세포는 상기 MLR 분석에서 $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식을 태반 세포가 없는 경우와 비교하였을 때, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 억제한다. 이 방법은 다른 면역 세포의 활성화, 예를 들어 자연세포독성(NK) 세포의 활성을 억제하는 등의 면역 조절이 가능한 태반 세포군의 선별 및/또는 제조 단계를 더 포함할 수 있다.

<43> 2.4 세포 배양하의 성장

<44> 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포의 성장은, 모든 포유류 세포와 마찬가지로 세포 성장용으로 선택한 특정 배지에 부분적으로 달려있다. 최적 조건 하에서 태반 줄기세포는 3~5 일만에 배증하는 것이 전형적이다. 세포 배양 중에 본 발명에 따른 상기 태반 줄기세포는 배양 기질, 예를 들어 조직 배양 용기의 표면(조직 배양 접시, 플라스틱, 피브로넥틴 피복 플라스틱 등)에 부착하여 단일 세포층을 이룬다.

<45> 본 발명의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군은 적절한 조건 하에서 배양되었을 때 배아유사체(embryoid-like body), 즉 상기 부착 줄기세포층 위로 세포가 자란 3차원적 덩어리를 형성한다. 상기 배아유사체 내부의 세포는 배양 기질에 부착하지 않는 것이 전형적인 경우이고, 이는 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포도 마찬가지이지만, 배양 도중에서는 부착 세포에 달라붙은 채로 있다. 배아유사체 세포는 생존을 위하여 부착 태반 줄기세포에 의존하는데, 배아유사체는 부착 줄기세포의 부재하에서는 형성되지 않는다. 상기 부착 태반 줄기세포는 따라서 부착 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군 속에서 하나 또는 그 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다. 어떤 이론에 구애받고자 하는 것은 아니지만, 이 배아유사체 세포는 배아 줄기세포가 피더(feeder) 세포층 위에 자라는 것처럼 부착 태반 줄기세포 위에서 성장하는 것으로 생각된다. 골수 유래 중간엽 줄기세포 등의 중간엽 줄기세포는 배양시 배아유사체를 형성하지 않는다.

<46> 2.5 세포 분화

- <47> 본 발명의 방법에 유용한 태반 줄기세포는 다른 수임 세포 계통(committed cell lineage)로 세포 분화할 수 있다. 예를 들어, 이 태반 줄기세포는 지방 세포 형성(adipogenic), 연골 형성(chondrogenic), 신경 형성(neurogenic) 또는 골 형성(osteogenic) 세포 계통의 세포로 분화할 수 있다. 이러한 분화는 이 분야 종래 기술의 어떠한 분화 방법, 예를 들어, 골수 유래 중간엽 줄기세포를 비스한 세포 계통으로 분화하는 방법을 이용하여 달성하더라도 무방하다.
- <48> **3. 태반 줄기세포를 얻는 방법.**
- <49> 3.1 줄기세포 수집용 조성액
- <50> 본 발명은 나아가 태반 줄기세포를 수집하고 분리하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 줄기세포는 생리학적으로 적합한 용액, 예를 들어 줄기세포 수집용 조성액(stem cell collection composition)을 포유류 태반으로부터 얻게 된다. 줄기세포 수집용 조성액은 2005년 12월 29일자 관련 미국 예비 출원 제60/754,969호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 자세하게 기재되어 있다.
- <51> 줄기세포 수집용 조성액은 줄기세포의 수집 및/또는 배양에 적당한 모든 생리학적으로 적합한 용액을 함유할 수 있는데, 여기에는 식염수(예를 들어 인산염 완충 식염수, Krebs 용액, 변형 Krebs 용액, Eagle 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지(DMEM, H.DMEM 등) 등이 있다.
- <52> 줄기세포 수집용 조성액은 태반 줄기세포를 보존하는 성질이 있는 성분을 하나 이상 갖추고 있을 수 있는데, 보존이란 즉 수집으로부터 시작하여 배양시까지 태반 줄기세포의 사멸을 막거나, 사멸을 지연하거나, 세포군 속에서 사멸하는 태반 줄기세포의 수를 줄이거나 하는 등의 특성이다. 이러한 성분으로는 세포자멸사 억제제(예를 들어 카스파제(caspase) 억제제, JNK 억제제), 혈관 확장제(vasodilator, 예를 들어 황산마그네슘, 혈압 강하제, 심방 나트륨 이뇨 펩티드(atrial natriuretic peptide, ANP), 아드레노코르티코트로핀(adrenocorticotropin), 코르티코트로핀 방출 호르몬, 니트로프루시드나트륨(sodium nitroprusside), 히드랄라진(hydralazine), 아데노신 삼인산, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 인산디에스테르 가수분해 효소 억제제 등), 세포 괴사 억제제(예를 들어 2-(1H-인돌-3-일-3-펜틸아미노말레이미드, 디티오카르바미노피롤리딘 또는 클론아제팜), TNF- α 억제제 및/또는 산소 운반성 퍼플루오로카본(브롬화퍼플루오로옥틸, 브롬화퍼플루오로데실 등)을 들 수 있다.
- <53> 줄기세포 수집용 조성액은 금속단백 분해효소, 세린 단백질 가수분해 효소, 중성 단백질 가수분해 효소, 리보핵산 가수분해효소, 디옥시리보핵산 가수분해 효소 등의 조직 분해 효소를 하나 이상 갖출 수 있다. 이러한 효소에는 콜라겐 분해 효소(예를 들어 콜라겐 분해효소 I, II, III 또는 IV, *Clostridium histolyticum* 유래 콜라겐 분해 효소 등), 디스파제(dispace), 터모리신(thermolysis), 엘라스타제, 트립신, 리버라제(LIBERASE), 히알루로니다제(hyaluronidase) 등이 포함되지만 이들로 한정되는 것은 아니다.
- <54> 줄기세포 수집용 조성액은 살균 또는 정균(靜菌 bacteriostatic) 용도에 유효한 분량의 항생제를 포함할 수 있다. 몇몇 비제한적 실시 태양에서, 이 항생제는 마크롤리드(macrolide, 예를 들어 토브라마이신(tobramycin)), 세팔로스포린(세팔렉신(cephalexin), 세프라딘(cephradine), 세프록심(cefuroxime), 세프로질(cefprozil), 세파클로(cefaclor), 세픽심(cefixime) 또는 세파드록실(cefadroxil), 클라리트로마이신(clarithromycin), 에리트로마이신, 페니실린(페니실린 V 등) 또는 퀴놀론(오픈록사신(ofloxacin), 시프로플락신(ciprofloxacin) 또는 노르플록사신(norfloxacin)), 테트라사이클린, 스트렙토마이신이다. 특정 실시 태양에서, 이 항생제는 그램 양성 및/또는 그램 음성 세균, 예를 들어 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 등에 대한 활성이 있다.
- <55> 줄기세포 수집용 조성액은 다음 화합물을 하나 이상 갖추고 있을 수 있다:
- <56> 아데노신(약 1 mM에서 약 50 mM로), D-포도당(약 20 mM에서 약 100 mM), 마그네슘 이온(약 1 mM에서 약 50 mM), 분자량 20,000 달톤을 넘는 거대분자(예를 들어 합성 또는 천연 콜로이드, 텍스트란 등의 다당류 또는 폴리에틸렌 글리콜)로서 한 실시 태양에서는 내피의 정상적인 상태와 세포 생존능을 유지하기에 충분한 분량(약 25 g/L에서 약 100 g/L, 또는 약 40 g/L에서 약 60 g/L), 항산화제(예를 들어 약 25 μ M 내지 약 100 μ M 농도의 부틸화 수산화아니솔, 부틸화 수산화톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E), 환원제(약 0.1 mM 내지 약 5 mM 농도의 N-아세틸시스테인), 세포로의 칼슘 유입을 방지하는 제제(약 2 μ M 내지 약 25 μ M의 베라파밀(verapamil)), 니트로글리세린(예를 들어 약 0.05 g/L 내지 약 0.2 g/L), 항응고제로서 한 실시 태양에서는 잔류 혈액의 응고를 막기에 충분한 양(예를 들어 헤파린 또는 히루딘 약 1000 단위/L 내지 약 100,000 단위/L), 또는 아밀로리드(amiloride) 함유 화합물(예를 들어 아밀로리드, 아밀로리드에틸이소프로필, 아밀로리드헥사메

틸렌, 아밀로리드디메틸 또는 아밀로리드이소부틸 약 1.0 μM 내지 약 5 μM).

<57> 3.2 태반의 수집과 취급

<58> 일반적으로 사람 태반은 출산 후 태반을 압박 방출한 직후에 회수된다. 바람직한 실시 태양에서 이러한 태반은 환자의 완전한 병력을 얻은 후 이를 그 태반에 연관짓는 다음 환자에게 충분한 설명 이후 동의를 받아서 회수된다. 이러한 병력 기록은 분만 이후에도 계속 기록되는 것이 바람직하다. 이러한 병력 기록은 태반 또는 그로부터 얻은 줄기세포의 후속 이용을 조화시키는데 쓰일 수 있다. 예를 들어, 살마 태반 줄기세포는 병력을 감안하여, 상기 태반에 관련된 신생아 또는 그 신생아의 부모, 형제나 다른 친척의 개인화된 의료(personalized medicine)에 쓰일 수 있다.

<59> 태반 줄기세포의 회수 전에 제대혈과 태반 혈액을 제거하게 된다. 몇몇 실시 태양에서 분만 후 태반 속 제대혈을 제거하게 된다. 이러한 태반에 대해서는 통상적인 제대혈 회수 방법을 사용할 수 있다. 바늘 또는 카눌라(cannula)를 써서, 중력을 이용하여 태반을 실험(exsanguination)하는 것이 전형적이다(Anderson의 미국 특허 제5,372,581호, Hessel 외 미국 특허 제5,415,665호를 보라). 이 바늘 또는 카눌라는 탯줄 정맥에 대개 놓이고 되고, 태반을 부드럽게 마사지하여 제대혈이 태반으로부터 빠져나오는 것을 돕는다. 이러한 제대혈 회수법은 상업적으로, 예를 들어 미국 뉴저지주 Cdear Knolls의 LifeBank Inc., ViaCord, Cord Blood Registry나 Cryocell을 통하여 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 이러한 태반을 다른 조작 없이 중력만으로 방혈시켜 제대혈 회수 과정에서의 조직 손상을 최소화한다.

<60> 태반은 제대혈을 회수하고 줄기세포를 수집하기 위한 예를 들어 관류 또는 조직 분리를 위하여 분만 장소나 분만실로부터 다른 장소, 예를 들어 실험실로 운반되는 것이 전형적인 경우이다. 이러한 태반은 멸균되고, 단열된 운반 장비(태반 온도를 20~28°C로 유지), 예를 들어 멸균 집록(zip-lock) 플라스틱백에 태아에 가까운 부위의 탯줄을 집게로 집은 태반을 단열 용기에 담아서 운반되는 것이 바람직하다. 다른 실시 태양에서 이러한 태반은 2005년 9월 19일 출원 미국 특허 출원 제11/230,760에 기술된 것과 실질적으로 같은 제대혈 수집 키트에 담겨 운반된다. 이 태반은 분만 후 4~24 시간 안에 실험실로 운반되는 것이 바람직하다. 몇몇 실시 태양에서 태아에 가까운 쪽 탯줄을 집게로 집게 되는데, 이때 제대혈 회수 전에 태반 원반(placental disk)의 삽입 지점으로부터 4~5 cm 내 위치를 집는 것이 바람직하다. 다른 실시 태양에서 태아에 가까운 쪽 탯줄은 제대혈 회수 후이고 태반의 후속 처리 전에 집게로 집히게 된다.

<61> 줄기세포 수집 전에 태반을 멸균 조건에서 실온 또는 5~25°C의 온도에서 저장할 수 있다. 이러한 태반은 48 시간보다 더 긴 기간 동안 저장될 수도 있으며, 바람직하게는 잔류 제대혈을 모두 제거하기 위한 태반 관류 4~24 시간 전까지 저장하게 된다. 이 태반은 5~25°C 온도에서 항응고제 용액 속에 저장되는 것이 바람직하다. 적절한 항응고제 용액은 이 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 워페린나트륨(warfarin sodium)을 쓸 수 있다. 바람직한 실시 태양에서, 이 항응고제 용액은 헤파린 용액(예를 들어 1:1000 희석 용액에서 1% w/w)을 포함한다. 이렇게 실험된 태반의 저장 시간은 태반 줄기세포를 수집하기 36 시간 전을 넘기지 않는 것이 바람직하다.

<62> 위에 기술한 취지대로 수집과 준비를 마친 포유류 태반 또는 그의 일부분으로부터 종래 기술에 따른 모든 방법, 예를 들어 관류 또는 하나 이상의 조직 파괴 효소를 이용한 소화 등의 파괴에 의하여 줄기세포를 얻을 수 있다.

<63> 3.3 태반 조직의 물리적 파괴와 효소 소화

<64> 한 실시 태양에서, 줄기세포는 물리적 파괴, 예를 들어 태반의 효소 소화에 의하여 포유류 태반으로부터 얻어진다. 본 발명에 따른 줄기세포 수집용 조성액에 접촉하고 있는 채로이 태반 또는 그 일부분을 예를 들어, 갈거나, 잡아 떼거나, 저미거나, 네모난 조각으로 썰거나, 잘게 썰거나, 액체에 담그어 연화시키는 등으로 처리할 수 있고 이어 하나 이상의 효소로 조직을 소화할 수 있다. 이러한 태반 또는 그 일부분을 하나 이상의 효소로 물리적으로 파괴하고 소화하여, 얻은 물질을 본 발명의 상기 줄기세포 수집용 조성액에 담그거나 섞을 수 있다. 예를 들어 트리판블루 배제법에 의하여 측정된 상기 장기 속의 세포 중 생존 세포 비율이 다수인 한, 바람직하게는 과반수인 한, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%인 한 어떠한 물리적 파괴 방법도 사용할 수 있다.

<65> 태반은 물리적 파괴 및/또는 효소 소화와 줄기세포 회수 단계 전에 구성 성분들로 나뉠 수 있다. 예를 들어, 태반 줄기세포는 양막, 융모막, 태반엽, 또는 이들의 모든 조합으로부터 얻을 수 있다. 태반 줄기세포는 양막과 융모막을 함유한 태반 조직에서 얻는 것이 바람직하다. 태반 줄기세포는 태반 조직의 작은 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 1000 mm²인 태반 조직의 덩어리를 파괴하여 얻는 것이 전형적인 경우이다.

- <66> 바람직한 줄기세포 수집용 조성액은 조직 파괴 효소를 하나 이상 갖추고 있다. 효소 소화는 여러 효소의 조합, 예를 들어 매트릭스 금속단백 분해 효소와 중성 단백질 분해 효소나 예를 들어 콜라겐 분해 효소와 디스파제의 조합을 이용하면 바람직하다. 한 실시 태양에서 태반 조직의 효소 소화에서는 금속단백 분해 효소, 중성 단백 분해 효소, 히알루론산의 소화를 위한 콜라겐 분해 효소의 조합과 같은 점액 용해성(mucolytic) 효소, 디스파제와 히알루로니다제 또는 LIBERASE(미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재 베링거 만하임 회사)과 히알루로니다제의 조합으로 이루어진 효소 조합을 사용한다. 태반 조직 파괴에 쓰일 수 있는 다른 효소로는 파파인, 디옥시리보핵산 가수분해효소, 트립신, 키모트립신 또는 엘라스타제와 같은 세린 단백 분해 효소를 들 수 있다. 세린 단백 분해 효소는 혈청 속 알파-2-마이크로글로불린에 의하여 억제될 수 있으므로 소화에 사용되는 배지는 혈청이 포함되어 있지 않아야 한다. EDTA와 디옥시리보핵산 분해 효소는 세포 회수율을 높이기 위하여 효소 소화에 흔히 사용된다. 끈적한 소화물 속에 줄기세포가 갇히는 일을 막기 위하여 소화물을 희석하는 것이 바람직하다.
- <67> 조직 소화 효소의 모든 조합 역시 사용될 수 있다. 조직 소화 효소의 전형적인 농도로는 예를 들어 콜라겐 분해 효소 I과 IV의 경우 50~200 단위/mL, 디스파제의 경우 10 단위/mL, 엘라스타제의 경우 10~100 단위/mL을 들 수 있다. 태반 줄기세포를 방출하기 위하여 단백질 분해 효소를 조합하여, 즉 둘 이상의 단백질 분해 효소를 같은 효소 소화 반응에 사용하거나, 순서대로 사용할 수 있다. 예를 들어, 한 실시 태양에서는 태반 또는 그 일부분을 30 분 동안 적절한 양의 2 mg/mL 콜라겐 분해 효소 I로 먼저 소화시킨 다음, 37℃에서 10 분 동안 0.25% 트립신으로 소화한다. 다른 효소를 사용한 다음 이어서 세린 단백 분해 효소를 이용하는 것이 바람직하다.
- <68> 다른 실시 태양에서 상기 줄기세포를 함유하는 상기 줄기세포 수집용 조성액 또는 줄기세포 수집용 조성액에서 줄기세포를 분리하기 전에 이 조직을 파괴 및/또는 소화한 용액에, 킬레이트제, 예를 들어 에틸렌글리콜 비스(2-아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산(EGTA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 가하여 이 조직을 더 파괴할 수 있다.
- <69> 온전한 태반 또는 태아와 모체 세포 양쪽을 포함하는 그 태반의 일부(예를 들어, 태반에서 융모막과 태반엽을 함유하는 부분)를 이용하는 경우, 수집한 상기 태반 줄기세포는 모체와 태아 양쪽에서 유래한 태반 줄기세포를 포함한다는 것을 이해할 필요가 있다. 모체 세포(양막 등)를 전혀 가지고 있지 않거나 또는 무시할 수 있는 정도로 가지고 있는 태반의 일부분이 쓰인 경우는 수집한 상기 태반 줄기세포가 거의 전적으로 태아 태반 줄기세포이다.
- <70> 3.4 태반 관류
- <71> 태반 줄기세포는 또한 포유류 태반을 관류하여 얻을 수 있다. 포유류 태반을 관류하여 줄기세포를 얻는 방법, 예를 들어 Hariri의 미국 출원 공보 제2002/0123141호와 2005년 12월 29일자 관련 미국 예비출원 제 60/754,969호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 개시되어 있다.
- <72> 태반 줄기세포는 관류, 이를 태면 관류 용액으로서 줄기세포 수집용 조성액을 이용하여 태반 혈관계를 관통하여 이루어질 수 있다. 한 실시 태양에서는 배꼽 동맥과 배꼽 정맥 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 관류 용액을 흘려보냄으로써 포유류 태반을 관류할 수 있다. 관류 용액을 태반에 흘려보내는 것은 예를 들어 중력을 이용하여 태반으로 흐르게 함으로써 이를 수 있다. 바람직하게는, 이 관류 용액을 연동(連動 peristaltic) 펌프 등의 펌프를 이용하여 강제로 태반에 주입한다. 배꼽 정맥은 예를 들어 멸균 도관(tubing)과 같은 살균된 연결부에 이어진 테플론 또는 플라스틱 재질 카눌라 등의 카눌라로 삽관될 수 있다. 이러한 살균된 연결부는 관류 매니폴드(manifold)에 연결된다.
- <73> 관류를 준비하면서 태반은 배꼽 동맥과 배꼽 정맥이 태반의 가장 높은 지점에 자리하도록 놓는(예를 들어 매달아 두는) 것이 바람직하다. 이 태반은 본 발명의 줄기세포 수집용 조성액 등의 관류 용액을 태반 혈관계 또는 태반 혈관계와 주변 조직에 통과시켜 관류할 수 있다. 한 실시 태양에서는 배꼽 동맥과 배꼽 정맥이 동시에 피펫에 연결되어 있는데, 이 피펫은 유연한 연결부를 통하여 관류 용액 저장소에 이어져 있다. 이 관류 용액은 배꼽 정맥과 동맥으로 흘러간다. 이 관류 용액은 상기 혈관들로부터 태반 주변 조직으로 스며나오고/스며나오거나 이들 혈관을 따라 주변 조직으로 흘러들어가며, 태반 표면으로부터 임신 도중 자궁에 붙인 적당한 열린 용기 속에 모이게 된다. 이 관류 용액은 한편 탯줄의 구멍을 통하여 주입할 수도 있으며, 모체 자궁벽에 접하고 있는 태반의 벽에 있는 구멍 속으로 흘러들어가거나 구멍으로부터 걸러나올 수 있다. 다른 실시 태양에서는 이

관류 용액으로 하여금 배꼽 정맥을 지나게 하여 배꼽 동맥에서 모으거나 배꼽 동맥을 지나게 하여 배꼽 정맥에서 모을 수 있다.

- <74> 한 실시 태양에서 태아쪽 탯줄은 관류 동안 집게로 집히게 되며, 더 바람직하게는 태반 원반에 탯줄이 삽입되는 지점에서 4~5 cm 이내 위치에서 집게로 집히게 된다.
- <75> 실혈(exsanguination) 과정에서 포유류 태반으로부터 처음 얻은 관류액은 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구 때문에 색깔을 띠는 것이 일반적이다. 이 관류액은 관류가 진행됨에 따라서 색깔이 옅어지며, 잔류 제대혈 세포들은 태반에서 씻겨 나간다. 일반적으로 태반을 처음에 실혈하는데는 30에서 100 mL의 관류액이면 충분하지만 관측된 결과에 따라 관류액의 양을 가감할 수 있다.
- <76> 태반 줄기세포를 수집하는데 쓰이는 관류액의 양은 수집할 줄기세포의 수, 태반의 크기, 한 태반에서 수집할 회수 등에 따라 달라진다. 많은 실시 태양에서, 관류액의 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 mL이다. 실혈 후 700~800 mL의 관류액으로 태반을 관류하는 것이 전형적인 경우이다.
- <77> 태반을 여러 시간 또는 여러 날에 걸쳐서 여러 번 관류할 수 있다. 여러 번 태반을 관류하는 경우, 무균 조건 하의 용기 또는 적절한 담체 속에서 태반을 유지하고 배양하고 항응고제(예를 들어 헤파린, 위페딘나트륨, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)를 포함하거나 포함하지 않은 줄기세포 수집용 조성액 또는 표준 관류 용액(예를 들어 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 정상적인 식염수)으로 관류할 수 있는데, 이 조성액 또는 관류 용액은 항생제(예를 들어 β -메르캅토에탄올(0.1 mM), 스트렙토마이신(예를 들어 40~100 μ g/mL 농도로), 페니실린(예를 들어 40 단위/mL), 암포테리신 B(예를 들어 0.5 μ g/mL))를 더 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 한 실시 태양에서 분리된 태반은 관류된 액체를 수집하지 않은 채로 일정 기간 유지되거나 배양되는데, 여기서 이 태반은 관류와 관류물 수집 이전에 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 동안, 혹은 이틀, 사흘 또는 더 오랜 동안 유지되거나 배양된다. 이렇게 관류된 태반은 한 번 또는 여러 번에 걸쳐 유지될 수 있는데, 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 동안 혹은 더 오랜 동안 유지할 수 있고, 이어서 두 번째 관류, 예를 들어 700~800 mL의 관류액으로 관류될 수 있다. 이 태반을 1, 2, 3, 4, 5회 또는 더 많이 관류할 수 있는데, 예를 들어 매 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 관류할 수 있다. 바람직한 실시 태양에서 이러한 태반의 관류와 관류 용액, 예를 들어 줄기세포 수집용 조성액의 수집은 회수한 유핵 세포 수가 100 세포/mL보다 아래로 떨어질 때까지 반복된다. 서로 다른 시점에서 얻은 관류물을 개별적으로 더 처리하여 시간 의존적인 세포군, 예를 들어 줄기세포군을 회수할 수도 있다. 서로 다른 시점에서 얻은 관류물을 한 데 모을 수도 있다.
- <78> 특정 이론에 구애받고자 하는 것은 아니지만, 태반을 실혈하 충분한 시간 동안 관류한 다음에 태반 줄기세포는 실혈되고 관류된 태반의 미세혈액순환 속으로 옮겨가서 본 발명의 방법에 따라 채집되는 것으로 생각되는데, 채집은 관류에 의하여 수집 용기 속으로 씻어넣는 방식이 바람직하다. 분리된 태반을 관류하면 잔류 제대혈을 제거할 수 있을 뿐 아니라 태반에 산소를 포함하는 적절한 양분을 공급할 수 있다. 이 태반은 배양되거나 제대혈을 제거하는데 쓰인 것과 유사한 용액으로 관류될 수 있는데, 이 용액에는 항응고제를 넣지 않는 것이 바람직하다.
- <79> 본 발명에 따른 방법으로 관류하면 포유류 태반을 상기 용액으로 관류하지 않고, 줄기세포를 얻기 위하여 다른 처리(예를 들어 효소 소화 등의 조직 파괴)를 하지도 않은 경우와 견주었을 때보다 유의미하게 더 많은 수의 줄기세포를 포유류 태반에서 얻을 수 있다. 여기서 "유의미하게 더 많은"이란 적어도 10% 이상 더 많은 것을 뜻한다. 본 발명에 따라 관류하면 유의미하게 더 많은 태반 줄기세포를 얻을 수 있는데, 예를 들어 태반 또는 그 일부분이 배양된 배양 배지로부터 djedfm 수 있는 태반 줄기세포 수보다 더 많다.
- <80> 줄기세포는 하나 이상의 단백 분해 효소 또는 다른 조직 파괴성 효소를 갖추고 있는 용액으로 관류하여 분리할 수 있다. 특정 실시 태양에서, 태반 또는 그 일부분(예를 들어 양막, 양막과 융모막, 태반 소엽(placental lobule) 또는 태반엽 혹은 이들의 모든 조합)의 온도는 25~37°C로 조절되고, 이를 200 mL의 배양 배지 속에서 하나 이상의 조직 파괴성 효소와 30 분 동안 배양하게 된다. 이 관류물로부터 세포를 수집하고, 4°C로 식힌 다음, 5 mM EDTA, 2 mM 디티오프레이톨과 2 mM 베타메르캅토에탄올을 함유하는 차가운 억제제 혼합물로 세척한다. 몇 분 후 줄기세포를 찬(예를 들어 4°C) 본 발명의 줄기세포 수집용 조성액으로 세척한다.
- <81> 이러한 걸러냄(pan) 방식, 즉 관류물이 태반의 모체쪽을 통하여 스며나오면 이를 수집하는 방식은 모체와 태아 세포가 섞여 나오게 된다는 것을 이해할 필요가 있다. 그 결과, 이 방법에 의하여 수집한 세포는 태아와 모체

유래 태반 줄기세포를 모두 가지는 혼합 집단을 포함한다. 반면에 오로지 태반 혈관계만을 통하여 관류하는 방식에서는 관류액을 하나나 두 개의 태반 혈관을 따라 흘러 보내게 되고 남아 있는 혈관을 통하여 이를 수집하게 되는데, 이 방식은 거의 전적으로 태아에서 유래한 태반 줄기세포군을 얻게 하여 준다.

<82> 3.5 태반 줄기세포의 분리, 분류와 특성 파악

<83> 효소 소화 방식이건 관류에 의하여 얻은 것이건 관계 없이, 포유류 태반에서 얻은 줄기세포는 처음에 피콜(Ficoll) 농도구배 원심분리를 하여 다른 세포로부터 정제할 수 있다. 이러한 원심분리는 원심분리 속도 등에 관한 모든 표준적인 실험 방법에 따라 이루어질 수 있다. 예를 들어 한 실시 태양에서는 태반에서 수집한 세포를 관류물에서 $5000 \times g$ 로 15분 동안 실온에서 원심분리하여 회수하는데, 이러한 원심분리로 파편이나 혈소판 등으로부터 줄기세포를 분리해낸다. 다른 실시 태양에서 태반 관류물은 약 200 mL로 농축되어, 피콜 위에 가해져 층을 이루고, 22°C 에서 20분 동안 약 $1100 \times g$ 로 원심분리되어, 세포의 저밀도 계면층을 후속 처리를 위하여 수집하게 된다.

<84> 세포 펠렛은 신선한 줄기세포 수집용 조성액 또는 줄기세포 유지에 적합한 배지, 예를 들어 2 단위/mL 헤파린과 2 mM EDTA(미국 뉴욕주 GibcoBRL)를 함유한 IMDM 무혈청 배지에 재현탁된다. 단핵 세포 총분획을 Lymphoprep (노르웨이 오슬로Nicomed Pharma사) 등으로 (제조사사의 설명에 따라) 분리한다.

<85> 본 명세서에서 태반 줄기세포의 "분리"란 처리하지 않은 포유류 태반 속에서 줄기세포와 정상적으로 결부되어 있는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%를 제거하는 것을 뜻한다. 한 장치에서 얻은 줄기세포를 포함하는 세포군은 처리하지 않은 상태의 그 장치 속에서 그 줄기세포와 정상적으로 결부되어 있는 다른 세포가 전체 세포의 50% 미만일 때 "분리"되었다고 할 수 있다.

<86> 관류나 소화에 의하여 얻은 태반 세포는 예를 들어 차등 트립신 처리(differential trypsinization)로 더 분리되거나, 처음에 이를 이용하여 분리할 수 있는데, 여기서는 0.2% EDTA(미국 미주리주 세인트루이스 Sigma사)를 함유한 0.05% 트립신 용액을 사용한다. 차등 트립신 처리는 태반 줄기세포가 플라스틱 표면으로부터 약 5분 이내에 탈착하는데 반하여 다른 부착 세포군은 20~30 분보다 더 많은 배양 시간을 요하는 것이 전형적인 경우이기 때문에 가능하다. 탈착된 태반 줄기세포는 트립산 처리와 트립신 중화 용액(Cambrex사의 TNS) 등을 이용한 트립신 중화 처리 후에 수집할 수 있다. 부착 세포를 분리하는 한 실시 태양에서는 예를 들어, $5 \sim 10 \times 10^6$ 개의 세포를 담은 분액을 여러 개의 T-75 플라스크에 각각 나누어 담게 되는데, 피브로넥틴 피복 T-75 플라스크가 바람직하다. 이 실시 태양에서는 세포를 시판되는 중간엽 줄기세포 성장 배지(Cambrex사의 MSCGM)으로 배양하고 조직 배양기(37°C , 5% CO_2) 속에 놓을 수 있다. 10~15 일 후 PBS 세척으로 비부착 세포를 상기 플라스크로부터 제거한다. 이어 PBS를 MSCGM으로 대체한다. 바람직하게는 플라스크를 날마다 점검하여 다양한 부착 세포 유형을 확인하는데, 특히, 섬유모세포 유형의 세포를 확인하고 세포군의 증폭 여부를 점검한다.

<87> 포유류 태반에서 수집한 세포의 수와 종류는 예를 들어 흐름세포 측정법, 세포 분류법, 면역세포화학(예를 들어 조직 특이적 또는 세포 표지 특이적 항체로 세포를 염색하는 것), 형광표지 세포 분리(FACS), 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting, MACS)와 같은 표준적인 세포 검출법을 이용한 세포 형태와 세포 표면 표지의 변화를 측정함으로써, 빛이나 공초점 현미경을 이용한 세포 형태 분석 및/또는 PCR과 유전자 발현 분석(profiling) 등의 공지 기술을 이용한 유전자 발현 변화 측정으로써 감시할 수 있다. 이러한 방법은 하나 또는 그 이상 의 특정 표지에 대하여 양성인 세포를 확인하는데에도 쓰일 수 있다. 예를 들어 상기 방법에 따라 CD34에 대한 항체를 이용하면 어느 세포가 CD34를 측정 가능한 양으로 함유하는지 알 수 있는데, 그러한 경우 이 세포는 CD34^+ 이다. 마찬가지로 어느 세포가 역전사 PCR로 측정할 수 있는 양의 OCT-4 RNA를 생산하거나, 성체 세포보다 유의미하게 더 많은 양의 OCT-4 RNA를 생산하는 경우, 이 세포는 OCT-4^+ 이다. 세포 표면 표지(예를 들어 CD34와 같은 CD 표지)와 OCT-4와 같이 줄기세포에 특이적인 유전자의 서열은 이 분야에 잘 알려져 있다.

<88> 태반 세포, 특히 피콜 분리, 차등 부착 또는 이들을 조합하여 분리한 세포는 형광표지 세포 분리 장치(FACS)를 이용하여 분류할 수 있다. FACS는 세포를 포함한 입자를 분류하는 공지의 방법으로서, 입자의 형광 특성에 바탕을 두고 있다(Kamarch의 Methods Enzymol, 151:150~165(1987)). 개별 입자의 형광부를 레이저로 들뜨게 하면 작은 전하가 발생하여 양과 음의 입자를 혼합물로부터 전자기적으로 분리할 수 있다. 한 실시 태양에서는 세포 표면 표지에 특이적인 항체 또는 리간드를 서로 다른 형광 표지로 표지한다. 이어서 사용된 항체에 결합하는지 여부에 따라 세포를 세포 분리기로 처리하여 분리한다. FACS로 분류된 입자들은 분리와 클로닝을 더 용이

하게 하기 위하여 곧바로 96-웰 또는 384-웰 플레이트의 개별 웰 속으로 운반될 수 있다.

<89> 한 세포 분류법에서는 태반에서 온 줄기세포를 CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 및/또는 HLA-G 표지의 발현 여부에 따라 분류한다. 이러한 분류는 배양시 세포 부착 특성에 따라 줄기세포를 선별하는 방법과 함께 이루어질 수도 있다. 예를 들어 세포 부착 선별 단계는 표면 표지 발현에 따른 세포 분류 단계 전 또는 후에 수행할 수 있다. 일례로 한 실시 태양에서는 세포를 먼저 CD34의 발현 여부에 따라 분류하는데, CD34⁻ 세포는 남기고, CD200⁺HLA-G⁺인 세포는 다른 모든 CD34⁻ 세포로부터 분리한다. 다른 실시 태양에서는 태반에서 얻은 세포를 CD200 및/또는 HLA-G 표지의 발현 여부에 따라 분류하는데, 예를 들어 이들 표지 중 어느 하나라도 나타내는 세포는 후속 용도를 위하여 분리한다. 특정 실시 태양에서는 예를 들어 CD73 및/또는 CD105의 발현 여부 혹은 항체 SH2, SH3 또는 SH4가 인식하는 항원 결정기의 존재 또는 CD34, CD38 또는 CD45의 미발현 여부에 따라 CD200 및/또는 HLA-G를 발현하는 세포를 추가적으로 분류할 수 있다. 한 실시 태양에서는 예를 들어, 태반 세포를 CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38과 CD45의 발현 또는 미발현에 의거하여 분류하고, CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 태반 세포를 후속 용도를 위하여 다른 태반 세포로부터 분리한다.

<90> 한 실시 태양에서는 자기 비드를 이용하여 세포를 분리한다. 입자가 자기 비드(지름 0.5~100 μm)에 결합하는 능력에 따라 입자를 분리하는 방법인 자기 활성화 세포 분류(MACS)에 의하여 이 세포들을 분류할 수 있다. 이 자성의 미세구에는 유용한 변형을 다양하게 가할 수 있는데, 특정 세포 표면 분자 또는 불완전 항원(hapten)을 인식하는 항체를 공유 결합으로 연결하는 것 역시 이 변형에 포함된다. 이어서 이러한 비드를 세포와 섞어 주어 결합을 유도한다. 이 세포를 자기장 속에 통과시켜 특정 세포 표면 표지를 가지는 세포를 분리해 낸다. 한 실시 태양에서는 이들 세포를 이어서 분리한 다음 다른 세포 표면 표지들에 특이적인 항체와 결합한 자기 비드와 다시 섞어주게 된다. 이들 세포를 다시 자기장 속에 통과시켜 상기 항체 양쪽에 결합한 세포를 분리한다. 이러한 세포는 클론 분리를 위하여 각각의 미량역가판(microtiter dish)에 희석해 넣을 수 있다.

<91> 한편 세포 형태와 성장 특성을 바탕으로 하여 태반 세포를 특성화 및/또는 분류할 수 있다. 예를 들어 태반 세포는 배아시 섬유모세포 유사(fibroblastoid) 형상을 나타내는 것으로 특성 파악 및/또는 상기 유사 형상을 근거로 선별될 수 있다. 태반 줄기세포는 또한 배아유사체 형성 능력에 따라 특성 파악 및/또는 선별할 수 있다. 예를 들어 한 실시 태양에서는, 섬유모세포 유사 형상이고, CD73 및CD105를 발현하며, 배양시 하나 또는 그 이상의 배아유사체를 형성하는 태반 세포를 나머지 태반 세포로부터 분리한다. 다른 실시 태양에서는, 배양시 하나 이상의 배아유사체를 생성하는 OCT-4⁺ 태반 세포를 나머지 태반 세포로부터 분리한다.

<92> 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 콜로니 형성 단위 분석(colony forming unit assay)를 이용하여 확인하고 특성 파악하게 된다. 콜로니 형성 단위 분석은 이 분야에서 널리 알려져 있는데, Mesen Cult(캐나다 브리티시 콜럼비아 주 밴쿠버의 Stem Cell Technologies, Inc.의 상표) 배양 배지를 예로 들 수 있다.

<93> 태반 줄기세포의 생존능, 증식 잠재성과 수명은 이 분야에 알려진 표준적인 기법을 이용하여 평가할 수 있는데, 이들 기법의 예는 다음과 같다: 트리판블루 배제 분석, 디아세트산폴루오레스사인 흡수 분석, (생존능 평가를 위한)요오드화프로피듐 흡수 분석, 티미딘 흡수 분석, (증식을 평가하는)MTT 세포 증식 분석. 수명도 장기 배양시 세포군 배증의 최대값을 측정하는 등의 이 분야에 잘 알려진 방법으로 알아낼 수 있다.

<94> 태반 줄기세포는 이 분야에 잘 알려진 기법을 이용하여 나머지 태반 세포로부터 분리할 수 있는데, 이러한 기법은 다음과 같은 것이 있다: 원하는 세포의 선택적인 성장(적극적 선별), 원하지 않는 세포의 선택적 파괴(소극적 선별), 대두 응집소(agglutinin) 등에 대한 혼합 세포군 내의 차별적 응집성에 바탕을 둔 분리법, 냉동-해동 과정, 여과, 통상적인 원심분리와 구역 원심분리, 원심분리 세정(centrifugal elutriation, counter-streaming centrifugation), 단위 중량(unit gravity) 분리, 대향류 분포법(countercurrent distribution), 전기 영동 등.

<95> 4. 태반 줄기세포의 배양

<96> 4.1 배양 배지(Culture media)

<97> 분리된 태반 줄기세포 또는 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포가 자라나오는 태반 조직은 세포 배양을 개시하거나 파종하는데 쓰일 수 있다. 세포는 라미닌, 콜라겐(예를 들어 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴과 세포외 막 단백질(미국 매사추세츠주 Bedford의 BD Discovery Labware사의 MATRIGEL)과 같

은 세포의 매트릭스 또는 리간드로 피복되거나 무피복인 무균 조직 배양 용기로 옮겨진다.

<98> 이 분야에서 줄기세포 배양 용도로 적합하다고 인정받은 모든 배양 배지 또는 배양 조건을 이용하여 태반 줄기 세포를 배양할 수 있다. 배양 배지는 혈청을 함유하는 것이 바람직하다. 태반 줄기세포는 예를 들어 다음 배양 배지를 이용할 수 있다: ITS(인슐린-트랜스페린-셀렌) 함유 DMEM-LG(Dulbecco's Modified Essential Medium, 저포도당)/MCDB 201(병아리 섬유모세포 기저(basal) 배지), LA+BSA(리놀레산+소 혈청 알부민), 포도당, L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-I와 페니실린/스트렙토마이신

<99> : 10% 소 태아 혈청(FBS) 함유 DMEM-HG(고 포도당), 15% FBS 함유 DMEM-HG, 10% FBS 함유 IMDM (Iscove 변형 Dulbecco 배지), 10% 말 혈청과 하이드로코르티손

<100> : 10% FBS 함유 M199, EGF와 헤파린

<101> : 10% FBS 함유 [α]-MEM(최소 필수 배지), 글루타맥스(상표)와 겐타마이신

<102> : 10% FBS 함유 DMEM, 글루타맥스와 겐타마이신 등.

<103> 바람직한 배지는 2% FBS 함유 DMEM-LG/MCDB-201, ITS, LA+BSA, 포도당, L-아스코르브산, PDGF, EGF와 페니실린/스트렙토마이신이다.

<104> 태반 줄기세포 배양에 쓰일 수 있는 다른 배양 배지에는 DMEM(고농도 또는 저농도의 포도당), Eagle 기본 배지, Ham F10 배지(F10), Ham F-12 배지(F12), Iscove 변형 Dulbecco 배지, 중간엽 줄기세포 성장 배지(MSCGM), Liebovitz L-15 배지, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, 개량 DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201(시그마사)와 CELL-GRO FREE가 포함된다.

<105> 이 배양 배지는 하나 또는 그 이상의 성분을 보충받을 수 있는데 이러한 성분으로는 혈청[예를 들어 바람직하게는 약 2~15%(v/v)인 소 태아 혈청, 소 혈청(ES), 사람 혈청(HS)], 바람직하게는 약 0.001%(v/v)인 베타-메르캅토에탄올(BME), 하나 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-I), 백혈병 억제 인자(LIF), 혈관내피 성장 인자(VEGF)와 에리트로포이에틴이 있으며, L-발린을 포함하는 아미노산, 그리고 미생물 오염을 조절하기 위한 하나 또는 그 이상의 항생제 및/또는 항진균약(antimycotic)이 있는데 항생제 및/또는 항진균약에는 페니실린 G, 황산스트렙토마이신, 암포테리신 B, 겐타마이신과 니아스타틴이 있으며 단독으로 또는 이들을 조합하여 쓸 수 있다.

<106> 4.2 태반 줄기세포의 증폭과 증식

<107> 분리된 태반 줄기세포 또는 분리된 줄기세포군(예를 들어 생체 내에서 줄기세포 또는 줄기세포군에 정상적으로 결부되어 있는 태반 세포들을 적어도 50% 떼어낸 줄기세포 또는 줄기세포군)을 얻은 뒤에는 이 줄기세포 또는 줄기세포군을 시험관내에서 증식시키고 증폭시킬 수 있다. 예를 들어 태반 줄기세포군은 배양 접시, 플라스크, 다중웰 플레이트 등의 조직 배양 용기에서 그 태반 줄기세포가 세포 합류(confluence) 조건의 70~90%에 이르는 데 충분한 시간, 즉 이 줄기세포와 그 자손이 조직 배양 용기 표면적의 70~90%를 차지할 때까지 배양할 수 있다.

<108> 태반 줄기세포는 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 파종할 수 있다. 예를 들어 이 세포들을 낮은 밀도(예를 들어 1 cm² 당 약 100에서 약 5000 세포) 내지 높은 밀도(1 cm² 당 약 50,000 세포 또는 그 이상)로 파종할 수 있다. 한 바람직한 실시 태양에서는 이들 세포를 공기 중 부피비 약 0 내지 5% 이산화탄소 속에서 배양한다. 몇몇 바람직한 실시 태양에서는 이들 세포를 공기 중 부피비 약 2 내지 약 25% 산소 속에서 배양하고, 바람직하게는 약 5 내지 약 20퍼센트 산소를 사용한다. 이들 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃, 바람직하게는 37℃에서 배양하게 된다. 이들 세포는 배양기 속에서 배양하는 것이 바람직하다. 배양 배지는 정지상이거나 교반될 수 있는데, 예를 들어 생반응기를 이용할 수 있다. 태반 줄기세포는 낮은 산화성 스트레스(글루타티온의 첨가, 아스코르브산, 카탈라아제, 토코페롤, N-아세틸시스테인 등) 하에서 성장하는 것이 바람직하다.

<109> 70%~90% 세포 합류를 이룬 다음에는 이들 세포를 계대할 수 있다. 예를 들어, 공지 기술을 이용하여 이들 세포를 효소 처리, 이를 테면 트립신 처리하여 조직 배양 표면으로부터 떼어낼 수 있다. 피펫으로 세포를 떼어내고 그 세포 수를 세어 약 20,000~100,000 줄기세포, 바람직하게는 약 50,000 줄기세포를 신선한 배양 배지를 담고 있는 새 배양 용기에 옮겨 계대한다. 이 새로운 배양 배지는 상기 줄기세포를 들어낸 배양 배지와 같은 종류인 것이 전형적인 경우이다. 본 발명은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 회, 또는 그

이상 계대한 태반 줄기세포군도 망라하고 있다.

<110> 4.3 태반 줄기세포군

<111> 본 발명은 태반 줄기세포군을 제공한다. 태반 줄기세포군은 하나 이상의 태반으로부터 곧바로 분리해 낼 수 있다. 즉, 이 태반 줄기세포군은 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군으로서, 관류물(perfusate)로부터 얻은, 혹은 관류물 안에 포함된 것이거나, 효소 소화물(digestate)로부터 얻은, 혹은 소화물 안에 포함된 것(즉 태반 또는 그 일부분을 효소 소화하여 수집한 세포)일 수 있다. 본 발명의 분리된 태반 줄기세포를 배양하고 증폭하여 태반 줄기세포군을 얻는데 사용할 수도 있다. 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군은 또한 배양하고 증폭하여 태반 줄기세포군을 얻는데 사용할 수도 있다.

<112> 본 발명의 태반 줄기세포군은 태반 줄기세포를 포함하는데, 예를 들어 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포를 포함한다. 많은 실시 태양에서는 분리된 태반 줄기세포군의 세포 중 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 태반 줄기세포이다. 즉 한 태반 줄기세포군에는 예를 들어 최대 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 비줄기세포가 포함될 수 있다.

<113> 본 발명은 효소 소화 방식이건 관류에 의하여 얻은 것이든 관계 없이, 특정 표지 및/또는 특정 배양 또는 형태적 특성을 띠는 태반 줄기세포를 선별함으로써 분리된 태반 줄기세포군을 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어 한 실시 태양에서는 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 기질(substrate)에 부착하고, (b) CD200과 HLA-G를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계와, 상기 세포를 다른 세포들로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 실시 태양에서 이 세포군의 제조 방법은 (a) 기질에 부착하고, (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계와, 상기 세포를 다른 세포들로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 실시 태양에서, 세포군을 제조하는 본 발명의 방법은 (a) 기질에 부착하고, (b) CD200과 OCT-4를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계와, 상기 세포를 다른 세포들로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 실시 태양에서, 세포군을 제조하는 본 발명의 방법은 (a) 기질에 부착하고, (b) CD73과 CD105를 발현하면서 (c) 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 태반 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는 태반 세포를 선별하는 단계와, 상기 세포를 다른 세포들로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 실시 태양에서, 세포군을 제조하는 상기 방법은 (a) 기질에 부착하고, (b) CD73, CD105와 HLA-G를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계와, 상기 세포를 다른 세포들로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 실시 태양에서, 세포군을 제조하는 상기 방법은 (a) 기질에 부착하고, (b) OCT-4를 발현하며, (c) 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 태반 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는 태반 세포를 선별하는 단계와, 상기 세포를 다른 세포들로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 상기 실시 태양 중 어느 것이라도, 이 방법은 ABC-p(태반 특이적인 ABC 운반(transporter) 단백질, Allikments 외 Cancer Res. 58(23): 5337~9(1998) 등을 참조하라)를 발현하는 태반 세포를 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 방법은 또한 예를 들어 중간엽 줄기세포에 특이적인 특성, 이를 태면 CD29의 발현, CD22의 발현, CD90의 발현 또는 이들 특성의 조합을 적어도 하나 갖추고 있는 세포를 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.

<114> 상기 실시 태양 중에서 기질은 세포 배양 및/또는 세포, 예를 들어 태반 줄기세포의 선별이 이루어질 수 있는 어떠한 표면이라도 좋다. 전형적인 경우, 기질은 플라스틱, 예를 들어 조직 배양 접시 또는 다중웰 플레이트의 플라스틱이다. 조직 배양 플라스틱은 라미닌 또는 피브로넥틴 등의 생분자로 피복될 수 있다.

<115> 태반 줄기세포 등의 세포를 선별하여 태반 줄기세포군을 얻는데 세포 선별 분야에서 알려진 모든 수단을 쓸 수 있다. 예를 들어, 흐름 세포 측정 또는 FACS에서 하나 이상의 세포 표면 표지에 대하여 특이적인 항체(들)를 이용하여 세포를 선별할 수 있다. 항체와 자기 비드를 같이 사용하여 선별할 수도 있다. 특정 줄기세포 관련 표지에 대하여 특이적인 항체가 이 분야에서 알려져 있다. 그 예로는 OCT-4(미국 매사추세츠주 캄브리지 Abcam), CD200(Abcam), HLA-G(Abcam), CD73(미국 캘리포니아주 샌디에고 BD Biosciences Pharmingen), CD105(abcam, 미국 메인주 Saco의 BioDesign International)에 특이적인 항체 등을 들 수 있다. 다른 표지에 대한 항체 역시 시판 중인데, 예를 들어 CD34, CD38과 CD45에 대한 항체를 StemCell Technologies 또는 BioDesign International로부터 구할 수 있다.

<116> 분리된 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포나 태반 세포가 아닌 세포를 함유할 수 있다.

<117> 분리된 태반 줄기세포군을 하나 이상의 비줄기세포 또는 비태반 세포 세포군과 혼합할 수 있다. 예를 들어 분

리된 태반 줄기세포군을 혈액(예를 들어 태반 혈액 또는 제대혈), 혈액 유래 줄기세포(예를 들어 태반 혈액 또는 제대혈 유래 줄기세포), 혈액 유래 유핵 세포군, 골수 유래 중간엽 세포, 골수 유래 줄기세포군, 미정제 골수, 성체(체세포) 줄기세포, 조직 내에 포함된 줄기세포군, 배양된 줄기세포, 완전 분화된 세포군(예를 들어 연골세포, 섬유모세포, 양막 세포, 뼈모세포, 근육 세포, 심근 세포 등) 등과 혼합할 수 있다. 분리된 태반 줄기세포군 속의 세포와 다수의 다른 유형 세포를, 각 세포군의 총 유핵세포수를 비교하여 혼합할 수 있는데 그 혼합 비율은 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 1:100,000,000이다. 분리된 태반 줄기세포군 속의 세포를 복수의 세포 유형을 가지는 복수의 세포들과 혼합할 수도 있다.

<118> 한 실시 태양에서는 분리된 태반 줄기세포군을 복수의 조혈 줄기세포와 혼합한다. 이러한 조혈 줄기세포는 예를 들어 다음 세포원으로부터 얻을 수 있다: 미처리된 태반 혈액, 제대혈 또는 말초 혈액 내, 태반 혈액·제대혈·말초 혈액 유래 총 유핵세포 속, 태반 혈액·제대혈·말초 혈액 유래 분리된 CD34⁺ 세포군, 미처리 골수, 골수 유래 총 유핵세포 속, 골수 유래 분리된 CD34⁺ 세포군 등.

<119> 5. 태반 줄기세포의 보존

<120> 태반 줄기세포는 보존될 수 있는데, 요컨대 장기 저장을 허용하는 조건 또는 세포 자멸사 또는 세포 괴사 등에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건하에 둘 수 있다.

<121> 태반 줄기세포는 예를 들어 2005년 12월 29일자 관련 미국 예비출원 제60/754,969호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 개시된 조성물인 세포 자멸사 억제제, 세포 괴사 억제제 및/또는 산소 운반성 퍼플루오로카본 함유 조성물을 이용하여 보존할 수 있다. 본 발명의 한 실시 태양에서는, 줄기세포군의 보존 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 줄기세포군을 세포 자멸사 억제제와 산소 운반성 퍼플루오로카본을 함유하는 줄기세포 수집용 조성액에 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 세포자멸사 억제제는 상기 세포자멸사 억제제로 처리하지 않은 줄기세포군과 비교하였을 때 상기 줄기세포군의 세포자멸사를 방지하거나 감소시키는데 충분한 양으로 존재한다. 한 특정 실시 태양에서, 상기 세포자멸사 억제제는 JNK 억제제이다. 더 특정한 실시 태양에서, 상기 JNK 억제제는 상기 줄기세포의 분화 또는 증식을 조절하지 못한다. 다른 실시 태양에서 상기 줄기세포 수집용 조성액은 상기 세포자멸사 억제제와 상기 산소 운반성 퍼플루오로카본을 별도의 층에 함유한다. 다른 실시 태양에서, 상기 줄기세포 수집용 조성액은 상기 세포자멸사 억제제와 상기 산소 운반성 퍼플루오로카본을 유탁액으로 함유한다. 다른 실시 태양에서, 상기 줄기세포 수집용 조성액은 유화제, 예를 들어 레시틴을 더 함유한다. 다른 실시 태양에서 상기 세포자멸사 억제제와 상기 산소 운반성 퍼플루오로카본은 상기 줄기세포와 접촉할 때 약 0℃ 내지 약 25℃에 있다. 다른 더 특정한 실시 태양에서, 상기 세포자멸사 억제제와 상기 산소 운반성 퍼플루오로카본은 상기 줄기세포와 접촉할 때 약 2℃ 내지 약 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃에 있다. 다른 더 특정한 실시 태양에서, 상기 접촉은 상기 줄기세포군의 운송시 이루어진다. 다른 더 특정한 실시 태양에서, 상기 접촉은 상기 줄기세포군의 냉동과 해동시에 이루어진다.

<122> 다른 실시 태양에서, 본 발명은 태반 줄기세포군의 보존 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 줄기세포군을 세포 자멸사 억제제와 장기 보존용(organ-preserving) 화합물에 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 세포자멸사 억제제는 상기 세포자멸사 억제제로 처리하지 않은 줄기세포군과 비교하였을 때 상기 줄기세포군의 세포자멸사를 방지하거나 감소시키는데 충분한 양으로 존재한다. 특정 실시 태양에서 상기 장기 보존용 화합물은 UW 용액(ViaSpan으로도 알려져 있으며 미국 특허 제4,798,824호에 기재됨. 또한 Southard 외, Transplantation 49(2):251-257 (1990))이거나 Stern 외, 미국 특허 제5,552,267호에 기재된 용액이다. 다른 실시 태양에서 상기 장기 보존용 화합물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산(lactobionic acid), 라피노스(raffinose) 또는 이들의 조합이다. 다른 실시 태양에서 상기 줄기세포 수집용 조성액은 산소 운반성 퍼플루오로카본을 2개의 층 또는 유탁액 형태로 더 포함한다.

<123> 본 발명 방법의 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 관류시 세포 자멸사 억제제, 산소 운반성 퍼플루오로카본, 장기 보존용 화합물 및 이들의 조합을 함유하는 줄기세포 수집용 조성액과 접촉시킨다. 다른 실시 태양에서는 상기 줄기세포를 효소 소화 등의 조직 파괴 과정 중에 접촉시킨다. 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 관류에 의한 세포 수집 또는 효소 소화 등의 조직 파괴에 의한 세포 수집 이후에 상기 줄기세포 수집용 조성

액에 접촉시킨다.

<124> 전형적인 경우, 태반 세포의 수집 과정, 농축 과정과 분리시에는 저산소증과 기계적 응력에 말미암은 세포 스트레스를 없애거나 최소화하는 것이 바람직하다. 본 방법의 다른 실시 태양에서는 따라서 줄기세포 또는 줄기세포군이 세포 수집, 농축 또는 분리 중에 저산소 조건에 노출되는 시간을 해당 보존 과정 도중에 6 시간 미만으로 줄이는데, 여기서 저산소 조건이란 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소 농도이다. 더 구체적인 실시 태양에서, 상기 줄기세포군은 상기 보존 과정 도중 상기 저산소 조건에 노출되는 시간이 2시간 미만이다. 다른 더 구체적인 실시 태양에서 상기 줄기세포군은 세포 수집, 농축 또는 분리 도중 상기 저산소 조건에 노출되는 시간이 1 시간 미만 또는 30 분 미만이거나 저산소 조건에 노출되지 않는다. 다른 구체적인 실시 태양에서 상기 줄기세포군은 세포 수집, 농축 또는 분리 도중 전단 응력을 받지 않는다.

<125> 본 발명의 태반 줄기세포는 냉동보존될 수 있는데, 예를 들어 냉동보존용 배지가 담긴 앰플 등의 소형 용기 속에 보존될 수 있다. 적절한 냉동보존용 배지로는 이를 태면 성장 배지 또는 시판되는 세포 냉동 배지 C2695, C2639, C60939(Sigma) 등의 세포 냉동 배지를 포함하는 배양 배지를 들 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다. 냉동보존용 배지는 DMSO(디메틸설폭사이드)를 이룰때면 약 10%(v/v) 농도로 포함하는 것이 바람직하다. 냉동보존용 배지는 메틸셀룰로오스 및/또는 글리세롤 등의 추가적 성분을 갖추고 있을 수 있다. 태반 줄기세포는 냉동보존시 분당 섭씨 1도씩 냉각하는 것이 바람직하다. 바람직한 냉동보존용 온도는 약 -80℃ 내지 약 -180℃, 바람직하게는 약 -125℃ 내지 약 -140℃이다. 냉동보존된 세포를 사용하기 위하여 해동하기 전에 액체 질소 속으로 옮길 수 있다. 예를 들어 몇몇 실시 태양에서는 앰플의 온도가 약 -90℃에 이르면 이를 액체 질소 저장 공간으로 옮긴다. 냉동보존된 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃, 바람직하게는 약 37℃의 온도에서 해동하는 것이 바람직하다.

<126> 6. 태반 줄기세포의 용도

<127> 6.1 태반 줄기세포 함유 조성물

<128> 본 발명의 면역 억제 방법은 태반 줄기세포 또는 그들로부터 얻은 생분자를 함유하는 조성물을 사용할 수 있다. 마찬가지로 방식으로 본 발명에 따른 복수의 태반 줄기세포와 줄기세포군은 예를 들어 연구 또는 치료 용도의 생리학적으로 적합 또는 의학적으로 적합한 모든 화합물, 조성물 또는 장치와 결합하여 쓰일 수 있다.

<129> 6.1.1 냉동보존된 태반 줄기세포

<130> 본 발명의 면역억제성 태반 줄기세포군은 보존될 수 있는데, 이를테면 나중에 사용하기 위하여 냉동보존될 수 있다. 줄기세포와 같은 세포의 냉동 보존을 위한 방법은 잘 알려져 있다. 태반 줄기세포군은 개체에게 쉽게 투여할 수 있는 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어 본 발명은 의학 용도에 적합한 용기에 담긴 태반 줄기세포군을 제공한다. 이러한 용기의 예로는 무균 플라스틱백, 플라스크, 단지(jar) 또는 상기 태반 줄기세포군을 쉽게 꺼낼 수 있는 다른 용기를 들 수 있다. 예를 들어 이 용기는 혈액백 또는 다른 플라스틱, 수용 대상에게 정맥 투여하기 적합한, 의학적으로 허용되는 백일 수 있다. 이 용기는 통합한 줄기세포군의 냉동보존을 지원하는 것이 바람직하다.

<131> 냉동보존된 면역억제성 태반 줄기세포군은 한 기증자 또는 여러 기증자로부터 유래한 태반 줄기세포를 포함할 수 있다. 이 태반 줄기세포군은 의도한 수용자와 완벽하게 HLA 유형이 맞거나, 부분적 또는 완전히 HLA-불일치할 수 있다.

<132> 따라서 본 발명의 한 실시 태양에서는 면역억제성 태반 줄기세포군을 용기에 담은 조성물을 제공한다. 한 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포군을 냉동보존한다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 용기가 백, 플라스크 또는 단지이다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 백이 무균 플라스틱 백이다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 백이 상기 태반 줄기세포군의 정맥 투여에 적합하거나, 이를 허용하거나 촉진한다. 이 백은 투여 전 또는 도중에 약물 등의 용액이 하나 이상 상기 태반 줄기세포와 섞일 수 있도록 서로 연결된 내부 빈 공간(lumen) 또는 구획을 여러 가지고 있을 수 있다. 다른 구체적 실시 태양에서는 이 조성물이 통합 줄기세포군의 냉동보존을 촉진하는 화합물을 하나 이상 함유한다. 다른 구체적 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포군이 생리적으로 허용되는 수용액 속에 함유되어 있다. 더 특정한 실시 태양에서는 상기 생리적으로 허용되는 수용액이 0.9% NaCl 용액이다. 다른 구체적 실시 태양에서, 상기 태반 줄기세포군은 상기 줄기세포군의 투여 대상자와 HLA 유형이 일치하는 태반 세포를 함유한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 통합 줄기세포군은 적어도 부분적으로 상기 줄기세포군의 투여 대상자와 HLA-불일치하는 태반 세포를 함유한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 복수의 기증자에서 유래한 것이다.

- <133> 6.1.2 약학 조성물
- <134> 면역 억제성 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 생체 내에서 사용하기 위한 약학 조성물로 제형화할 수 있다. 이러한 약학 조성물은 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 약학적으로 허용되는 담체속에 포함하고 있는데, 이러한 담체로는 식염수 또는 생체내 투여에 적합한 다른 생리적으로 허용되는 용액을 들 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 태반 줄기세포군 또는 본 명세서에서 언급한 태반 줄기세포 유형 중 아무 것이나 함유하여도 좋다. 본 발명의 약학 조성물은 태아, 모체 또는 양쪽 태반 줄기세포를 모두 갖추고 있을 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 나아가 단일 기증자 또는 그 태반이나 여러 기증자 또는 그 태반들에서 유래한 태반 줄기세포를 포함할 수 있다.
- <135> 본 발명의 약학 조성물은 면역억제성 태반 줄기세포를 얼마든지 함유할 수 있다. 예를 들어 여러 실시 태양에서 태반 줄기세포 1회 투여량은 적어도 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 이보다 더 많은 수의 태반 줄기세포를 함유하거나, 적어도 이 정도 수의 줄기세포를 함유하거나, 혹은 이 정도 수 이하의 줄기세포를 함유한다.
- <136> 본 발명의 약학 조성물은 생존능이 있는 세포를 50% 이상(즉 세포군 속의 세포 중 적어도 50%가 기능을 발휘하거나 살아 있음) 갖춘 세포군을 포함한다. 적어도 세포군 속 세포의 60%가 생존능을 가지고 있는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 상기 약학 조성물 속 세포군의 세포 중 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 생존능을 가지고 있다.
- <137> 본 발명의 약학 조성물은 예를 들어 줄기세포 생착(engraftment)을 촉진하는 화합물(항-T 세포 수용체 항체, 면역 억제제 등), 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 히드록시에틸 전분 등의 안정제를 하나 이상 함유할 수 있다.
- <138> 있다. 다른 실시 태양에서 본 발명의 조건 배지는 태반 줄기세포와 비태반 줄기세포가 배양된 배지를 포함한다.
- <139> 따라서 본 발명의 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포 배양물로부터 얻은 배양 배지를 포함하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나 CD73, CD105와 CD200을 발현하거나 CD200과 OCT-4를 발현하거나 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나,
- <140> OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하고, (c) $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포의 배양은 상기 배지 속에서 24 시간 이상 이루어진 것이다. 특정 실시 태양에서 이 조성물은 복수의 상기 태반 줄기세포를 더 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 이 조성물은 복수의 비태반 세포를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 비태반 세포가 $CD34^+$ 세포, 예를 들어 말초 혈액 조혈 전구세포, 제대혈 전구세포 또는 태반 혈액 전구세포와 같은 조혈 전구세포를 포함한다. 상기 비태반 세포는 또한 골수 유래 중간엽 줄기세포와 같은 중간엽 줄기세포 등의 다른 줄기세포를 포함할 수 있다. 상기 비태반 세포는 또한 하나 이상의 종류의 성체 세포 또는 성체 세포주일 수 있다. 다른 특정 실시 태양에서 이 조성물은 항증식제, 예를 들어 항MIP-1 α 또는 항MIP-1 β 항체를 포함한다.
- <141> 6.1.4 태반 줄기세포를 함유하는 매트릭스
- <142> 본 발명은 면역 억제성 태반 줄기세포군을 함유하는 매트릭스, 하이드로겔, 3차원 골격(scaffold) 등을 더 포함한다.
- <143> 본 발명의 태반 줄기세포는 천연 매트릭스, 예를 들어 양막 소재와 같은 태반의 생물질에 파종할 수 있다. 이러한 양막 소재로는 포유류 태반에서 바로 절제된 양막, 고정되거나 열처리된 양막, 실질적으로 건조(즉 <20% H₂O)한 양막, 융모막, 실질적으로 건조한 융모막, 실질적으로 건조한 양막과 융모막 등을 들 수 있다. 태반 줄기세포를 파종할 수 있는 바람직한 태반 생물질은 Hariri의 미국 출원 공보 제2004/0048796호에 기재되어 있다.
- <144> 본 발명의 태반 줄기세포는 주사 등에 적합한 하이드로겔 용액 속에 현탁할 수 있다. 이러한 조성물에 적합한 하이드로겔로는 RAD16과 같은 자가 조립(self-assembling) 펩티드를 들 수 있다. 한 실시 태양에서는 상기 세

포를 함유하는 하이드로겔 용액을, 예를 들어 틀 속에서 굳혀서 착상(implantation)을 위하여 그 속에 세포를 함유하는 매트릭스를 형성할 수 있다. 이러한 매트릭스 속의 태반 줄기세포를 배양하여 착상 전에 체세포분열로 세포를 증폭할 수도 있다. 상기 하이드로겔은 예를 들어 유기 고분자(천연 또는 합성)로서 공유, 이온 또는 수소 결합을 통하여 가교되어 물을 가둘 수 있는 열린 3차원 격자를 만듦으로써 겔을 이룬다. 하이드로겔 형성 물질로는 알긴산과 그 염과 같은 다당류, 펩티드, 폴리포스파진(polyphosphazine)과 폴리아크릴레이트 등 이온 결합으로 가교되는 것들 혹은 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체와 같이 각각 온도, pH에 의하여 가교되는 블록 공중합체를 들 수 있다. 몇몇 실시 태양에서 본 발명의 상기 하이드로겔 또는 매트릭스는 생분해성이다.

<145> 본 발명의 몇몇 실시 태양에서는 상기 제형에 제자리(*in situ*) 중합성 겔이 포함된다(예를 들어 미국 특허 출원 공보 제2002/0022676호, Anseth 외, J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002) 또는 Wang 외, Biomaterials, 24(22):3969-80(2003)을 보라).

<146> 몇몇 실시 태양에서 이 고분자는 적어도 수용액 속에서 부분적으로 용해성인데, 수용액으로는 물, 완충 염 용액 또는 하전된 측쇄를 가지는 수성 알코올 용액 또는 그의 단일가 이온염을 들 수 있다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측쇄를 가지는 고분자의 예로는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메트아크릴산), 아크릴산과 메트아크릴산의 공중합체, 폴리(아세트산비닐)과 술폰화 폴리스티렌과 같은 술폰화 고분자를 들 수 있다. 산성 측쇄를 가지는 공중합체로서 아크릴산 또는 메트아크릴산과 비닐에테르 모노머 또는 고분자를 반응시켜 얻는 공중합체도 사용할 수 있다. 산성 측쇄의 예로는 카르복시기, 술폰산기, 할로젠화(바람직하게는 플루오르화) 알코올기, 페놀성 OH기와 산성 OH기가 있다.

<147> 본 발명의 태반 줄기세포 또는 이들의 공배양물을 3차원 구조 또는 골격에 파종된 다음 생체 내에서 착상(implant)시킬 수 있다. 이러한 구조는 하나 이상의 아무 성장 인자, 세포, 약물 혹은 조직 형성을 촉진시키거나 본 발명의 실시를 다른 방식으로 향상·개선하는 다른 성분과 조합함으로써 착상될 수 있다.

<148> 본 발명에 쓰일 수 있는 3차원 골격의 예로는 부직 매트, 다공성 포말 또는 자가 조립 펩티드를 들 수 있다. 부직 매트와 글리콜산과 락트산의 합성 흡수성 공중합체(PGA/PLA 등)를 포함하는 섬유(미국 뉴저지주 Somerville의 Ethicon Inc.사의 Vicryl)로부터 만들 수 있다. 포말은 예를 들어 동결건조 또는 냉동건조(미국 특허 제6,355,699호 등을 보라)와 같은 공정에 의하여 제조된 폴리(ϵ -카프로락탐)/폴리(글리콜산)(PCL/PGA) 공중합체로 구성된 포말을 3차원 골격으로 쓸 수도 있다.

<149> 본 발명의 태반 줄기세포는 생리적으로 허용되는 세라믹 소재에 파종하거나 접촉시킬 수 있는데, 이러한 세라믹 소재에는 인산모노-, 인산디-, 인산트리-, 인산알파트리-, 인산베타트리- 와 인산테트라칼슘, 수산화인회석, 불소인회석, 황산칼슘, 플루오르화칼슘, 산화칼슘, 탄산칼슘, 인산마그네슘칼슘, BIOGLASS(등록상표)와 같이 생활성이 있는 유리 및 이들의 혼합물이 포함되지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 현재 시판 중인 생체적합한 다공성 세라믹 소재에는 SURGIBONE(캐나다 CanMedica Corp.의 등록상표), ENDOBON(프랑스 Merck Biomaterial France의 등록상표), CEROS(스위스 Bettlach의 Mathys AG의 등록상표), 그리고 HEALOS(미국 매사추세츠주 Raynham의 DePuy, Inc.의 상표) VITOSS, RHAKOSS 및 CORTOSS(미국 펜실베이니아주 Malvern의 Orthovita의 등록상표들)와 같은 광물화 콜라겐 뼈 이식 제품 들이 포함된다. 이러한 구조는 천연 및/또는 합성 재료의 혼합물, 블렌드 또는 복합물일 수 있다.

<150> 다른 실시 태양에서 태반 줄기세포는 펠트에 파종하거나 접촉시킬 수 있는데, 이러한 펠트는 예를 들어 PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 블렌드 혹은 히알루론산과 같은 생흡수성 소재로부터 제조한 다중 필라멘트사(multifilament yarn)로 구성될 수 있다.

<151> 본 발명의 다른 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포를 복합 구조일 수 있는 포말 골격(foam scaffold)에 파종할 수 있다. 이러한 포말 골격은 체내에서 수리, 교체, 보강되어야 할 특정 구조 부분의 모양처럼 유용한 형태로 성형할 수 있다. 몇몇 실시 태양에서는 이 구조를 본 발명의 세포를 접종하기 전에 예를 들어 0.1M 아세트산 처리하고, 이어 폴리리신, PBS 및/또는 콜라겐과 배양하여 세포 부착을 향상시킬 수 있다. 매트릭스의 외부면을 변형하여 세포의 부착과 성장 및 조직의 분화를 향상할 수 있는데, 이러한 변형에는 매트릭스의 혈장 피복 또는 하나 이상의 단백질(예를 들어 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유), 당단백질, 글리코사미노글리칸(예를 들어 황산헤파린, 황산-4-콘드로이틴, 황산-6-콘드로이틴, 황산테르마탄, 황산케라틴 등), 세포 매트릭스 및/또는 다른 물질의 부가 있으며, 상기 물질은 젤라틴, 알긴산염, 한천, 아가로스 및 식물 검 등이 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- <152> 몇몇 실시 태양에서는 이 3차원 골격을 혈전 형성을 방지하는 물질로 처리하거나, 이 3차원 골격이 그러한 물질을 함유한다. 이러한 물질과 그 처리는 내피 성장, 이동과 세포의 매트릭스 축적을 촉진하고 유지한다. 이러한 물질과 처리법의 예로는 라미닌과 제IV형 콜라겐과 같은 기저막 단백질, EPTFE 등의 합성 물질, PURSPAN(미국 캘리포니아주 버클리의 The Polymer Technology Group Inc.의 상표) 등의 분절된 폴리우레탄요소 실리콘을 들 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 3차원 골격은 또한 헤파린과 같은 항혈전 형성제를 함유할 수 있다. 태반 줄기세포의 파종 전에 상기 골격을 처리하여 표면 전하를 변화(예를 들어 혈장으로 피복)시킬 수 있다.
- <153> 6.2 무한증식화된 태반 줄기세포주
- <154> 포유류 태반 세포는 성장 촉진 유전자를 함유하는 모든 적절한 벡터를 이용하여 전환(transfection)됨으로써 조건부로 무한 증식(conditionally immortalized)할 수 있는데, 여기서 성장 촉진 유전자는 적절한 조건 하에서 전환된 세포의 성장을 촉진하여, 상기 성장 촉진 단백질의 제조 및/또는 활성을 외부 인자로 조절할 수 있게 하는 것이다. 상기 성장 촉진 유전자의 바람직한 실시 태양은 종양유전자인데, 예를 들면 v-myc, N-myc, c-myc, p53, SV40 대형 T 항원, 폴리오마 대형 T 항원, E1a 아데노바이러스 또는 사람 파필로마바이러스의 E7 단백질이지만 여기에 한정되지는 않는다.
- <155> 상기 성장 촉진 단백질의 외부 조절은 상기 성장 촉진 유전자를 외부 조절 가능한 프로모터, 예를 들어 전환된 세포의 온도를 조절하거나 세포와 접촉하는 배지의 조성을 바꿈으로써 그 활성을 조절할 수 있는 프로모터의 조절하에 됨으로써 이를 수 있다. 한 실시 태양에서는 테트라사이클린(tet) 조절 유전자 발현 시스템(Gossen 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992 또는 Hoshimaru 외, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996을 보라)을 이용할 수 있다. tet의 부재 하에서는 이 벡터 내부에 자리잡은, tet에 의하여 조절되는 트랜스 활성화 인자(tTA)가 ph_{CMV}^* 로부터 전사를 강하게 활성화하는데, ph_{CMV}^* 는 사람 사이토메갈로바이러스의 최소 프로모터와 tet 조절 유전자 서열에 연결된 것이다. tTA는 대장균의 전위유전단위(transposon)-10 유래 tet 저항 오페론의 억제자(tetR)와 헤르페스 심플렉스 바이러스 VP16의 산성 영역을 융합한 단백질이다. 낮고 독성이 없는 tet 농도(약 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$)에서는 tTA에 의한 트랜스 활성화가 거의 중단된다.
- <156> 한 실시 태양에서 이 벡터는 선별용 표지, 예를 들어 약물 내성을 부여하는 단백질을 암호화하는 유전자를 더 포함한다. 세균 네오마이신 내성 유전자(neo^R)는 본 발명에 쓰일 수 있는 표지의 한 예이다. neo^R을 가진 세포는 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 G418을 성장 배지에 부가하는 것과 같이 당업자에게 잘 알려진 수단을 써서 선별할 수 있다.
- <157> 세포의 전환은 역전사 바이러스 감염과 같이 당업자에게 잘 알려진(하지만 이것만으로 제한되지는 않는) 모든 수단을 사용하여 이루어질 수 있다. 일반적으로 세포 배양물의 전환은 상기 벡터를 생산하는 세포주로부터 수집한 조절 배지와 N2 보강 물질을 함유하는 DMEM/F12의 혼합물 속에서 세포를 배양함으로써 이루어질 수 있다. 예를 들어 상술한 바에 따라 마련한 태반 세포 배양물을 예를 들어 닷새 동안 시험관내 배양 후 상기 조절 배지 1부피와 N2 보강 물질을 함유한 DMEM/F12 2부피의 혼합물 속에서 약 20시간 동안 배양함으로써 감염시킬 수 있다. 선별용 표지를 갖춘 전환 세포는 앞서 설명한 바와 같이 선별할 수 있다.
- <158> 세포 전환 후에 배양물을 세포 증식을 허용하는 표면, 예를 들어 24 시간 동안 적어도 30%의 세포가 배증하도록 허용하는 표면 위에 계대한다. 이때 기질은 폴리오르니틴(10 $\mu\text{g/mL}$) 및/또는 라미닌(10 $\mu\text{g/mL}$)으로 피복한 조직 배양 플라스틱으로 이루어진 폴리오르니틴/라미닌 기질, 폴리리신/라미닌 기질 또는 피브로넥틴으로 처리한 표면인 것이 바람직하다. 이어서 이 배양물에 3~4 일마다 성장 배지를 가하여 주는데, 이 배지는 하나 이상의 증식 향상 인자로 보강되었거나 보강되지 않았을 수 있다. 증식 향상 인자는 배양물이 50% 세포 합류 수준 미만일 때 성장 배지에 추가한다.
- <159> 80~95% 세포 합류 수준일 때 트립신 처리와 같은 표준적인 방법을 이용하여 조건부 무한 증식 태반 줄기세포주를 계대할 수 있다. 약 스무번째 계대까지는 몇몇 실시 태양에서는 선별(예를 들어 네오마이신 내성 유전자를 가지는 세포를 선별용 G418 부가에 의한)을 유지하는 것이 바람직하다. 세포를 액체 질소에 얼려서 장기간 보존할 수 있다.
- <160> 앞서 설명한 방법에 따라 마련한 조건부 무한 증식 사람 태반 줄기세포주로부터 클론 세포주를 분리할 수 있다. 일반적으로 한계 희석(limit dilution)이나 클로닝 고리(cloning ring) 등의 표준적인 방법을 이용하여 이러한 클론 세포주를 분리하고 증폭할 수 있다. 클론 세포주는 일반적으로 앞서 기술한 방식에 따라 영양분을 공급하

고 계대해 줄 수 있다.

<161> 조건부 무한증식 사람 태반 줄기세포주는 클론성(clonal)일 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없으며, 분화를 촉진하는 배양 조건하에서 상기 성장 촉진 단백질의 제조 및/또는 활성을 억제함으로써 분화하도록 유도할 수 있는 것이 일반적인 경우이다. 예를 들어, 상기 성장 촉진 단백질을 암호화하는 유전자가 외부 조절 가능한 프로모터 조절을 받는 경우, 배지의 온도 또는 조성을 변화시켜 성장 촉진 유전자의 전사를 억제할 수 있다. 앞서 논한 테트라사이클린 조절 유전자 발현 시스템에서는 테트라사이클린을 가하여 상기 성장 인자의 전사를 억제함으로써 분화를 이룰 수 있다. 일반적으로 1 $\mu\text{g/mL}$ 테트라사이클린을 4~5일 동안 처리하면 분화를 일으키기에 충분하다. 더 분화를 일으키려면 성장 배지에 추가적인 성분을 넣을 수 있다.

<162> 6.3 분석 방법

<163> 본 발명의 태반 줄기세포는 분석 방법에서 이용하여 배양 조건, 환경 요인, 분자(예를 들어 생분자, 소형 무기 분자 등) 등이 줄기세포 증식, 증폭 및/또는 분화에 미치는 영향을 그러한 조건에 노출되지 않은 태반 줄기세포와 비교하여 살펴볼 수 있다.

<164> 한 바람직한 실시 태양에서는 본 발명의 태반 줄기세포를 분자에 접촉시켜 세포 증식, 증폭 또는 분화의 변화를 분석한다. 예를 들어 본 발명의 한 실시 태양에서는 복수의 태반 줄기세포의 증식을 조절하는 화합물을 동정하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 복수의 줄기세포를 증식을 허용하는 조건 하에서 상기 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 화합물과 접촉하지 못한 상기 복수의 줄기세포와 비교하였을 때 상기 화합물이 상기 복수의 줄기세포의 증식에 측정 가능한 변화를 일으키는 경우, 상기 화합물을 태반 줄기세포의 증식을 조절하는 화합물로 동정한다. 특정 실시 태양에서는 상기 화합물을 증식 억제제로 동정한다. 다른 특정 실시 태양에서는 상기 화합물의 증식 촉진제로 동정한다.

<165> 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포의 증폭을 조절하는 화합물을 동정하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 복수의 줄기세포를 증폭을 허용하는 조건 하에서 상기 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 화합물과 접촉하지 못한 상기 복수의 줄기세포와 비교하였을 때 상기 화합물이 상기 복수의 줄기세포의 증폭에 측정 가능한 변화를 일으키는 경우, 상기 화합물을 태반 줄기세포의 증폭을 조절하는 화합물로 동정한다. 특정 실시 태양에서는 상기 화합물을 증폭 억제제로 동정한다. 다른 특정 실시 태양에서는 상기 화합물의 증폭 촉진제로 동정한다.

<166> 다른 실시 태양에서, 본 발명은 태반 줄기세포의 분화를 조절하는 화합물을 동정하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 줄기세포를 분화를 허용하는 조건 하에서 상기 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 화합물과 접촉하지 못한 상기 줄기세포와 비교하였을 때 상기 화합물이 상기 줄기세포의 분화에 측정 가능한 변화를 일으키는 경우, 상기 화합물을 태반 줄기세포의 분화를 조절하는 화합물로 동정한다. 특정 실시 태양에서는 상기 화합물을 분화 억제제로 동정한다. 다른 특정 실시 태양에서는 상기 화합물을 분화 촉진제로 동정한다.

<167> 6.4 태반 줄기세포 은행

<168> 출산 후 태반으로부터 얻는 줄기세포를 수많은 다른 방식으로 배양하여 태반 줄기세포 룯(lot)의 집단, 예를 들어 개별적으로 투여 가능한 용량의 집단을 이룰 수 있다. 이러한 룯은 예를 들어 태반 관류물 또는 효소 소화된 태반 조직으로부터 얻을 수 있다. 복수의 태반으로부터 얻은 태반 줄기세포 룯의 집단은 예를 들어 장기 저장을 위한 태반 줄기세포의 은행 속에 정렬할 수 있다. 일반적으로 부착 줄기세포는 태반 재료의 초기 배양으로부터 파종 배양물(seed culture)을 형성하여 얻게 되고, 이를 통제된 조건 하에서 증폭시켜 대략 횡수로 배증시켜 세포군을 제조하게 된다. 룯들은 한 태반 조직으로부터 유래하는 것이 바람직하지만, 복수의 태반 조직으로부터 유래할 수도 있다.

<169> 한 실시 태양에서 줄기세포 룯은 다음과 같이 얻을 수 있다. 태반 조직을 먼저 파괴, 예를 들어 잘게 썰고 콜라겐 분해 효소 등(앞의 2.3을 보라)의 적절한 효소로 소화하여 파괴한다. 이 태반 조직은 예를 들어 하나의 태반에서 얻은 양막 전체, 융모막 전체 또는 양자 모두를 포함하는 것이 바람직하지만 양막 또는 융모막의 일부만 포함할 수도 있다. 소화된 조직은 예를 들어 1~3 주 동안 배양되는데, 바람직하게는 2 주가 좋다. 비부착성 세포를 제거한 다음, 형성되는 고밀도 콜로니를 수집, 예를 들어 트립신 처리를 통하여 수집한다. 이들 세포는 수집되어 편리한 분량의 배양 배지 속에 재현탁화되는데 이를 제0 계대(Passage 0) 세포라고 정의한다.

<170> 제0 계대 세포는 증폭 배양물(expansion culture)을 파종하는데 쓰인다. 증폭 배양물은 별개의 세포 배양

장치, 예를 들어 NUNC(상표)의 Cell Factory의 모든 배열일 수 있다.

- <171> 제0 계대 배양물 속의 세포는 증폭 배양물을 파종하기 위하여 얼마든지 나뉠 수 있는데, 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 , 10×10^4 개의 줄기세포로 증폭 배양물을 파종할 수 있다. 바람직하게는 약 2×10^4 내지 약 3×10^4 개의 제0 계대 세포를 이용하여 증폭 배양물을 파종한다. 증폭 배양물의 수는 제0 계대 세포의 수에 달려 있는데, 이 수의 다소는 상기 줄기세포를 얻은 특정 태반(들)에 달려 있다.
- <172> 증폭 배양물은 배양물 속 세포 농도가 일정한 값, 예를 들어 약 1×10^5 세포/cm²에 이를 때까지 성장시키게 된다. 이 시점에서는 세포를 수집하거나 냉동보존할 수 있고, 아니면 앞서 설명한 바와 같이 새로운 증폭 배양물로 계대할 수도 있다. 세포는 사용 전에 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19회 또는 20회 계대될 수 있다. 증폭 배양 도중에는 세포군 배증의 누적 횟수에 대한 기록을 가지고 있는 것이 바람직하다. 제0 계대 배양에서 얻은 세포는 배증 회수를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38회 또는 40회, 혹은 60회까지로 하여 증폭할 수 있다. 그러나 개별 투여량 별로 세포군을 나누기 전의 세포군 배증 횟수는 약 15 내지 약 30회, 바람직하게는 약 20회인 것이 적당하다. 이들 세포는 증폭 과정 내내 연속적으로 배양되거나, 증폭 도중 1회 이상 냉동될 수 있다.
- <173> 개별 투여에 쓰일 세포는 나중에 쓰기 위하여 냉동, 예를 들어 냉동보존될 수 있다. 개별 투여량에는 예를 들어 1 mL 당 약 1백만 내지 약 1억개의 세포가 포함될 수 있고, 그 총수는 약 10^6 내지 10^9 개이다.
- <174> 본 방법의 특정 실시 태양에서는 제0 계대 세포를 4회까지 배증하게 한 다음 1차 세포 은행 속에 냉동하여 둔다. 1차 세포 은행에서 나온 세포는 언 채로 있고 2차 세포 은행을 파종하는데 쓰이는데, 2차 세포 은행의 세포들은 약 8차례 더 배증하게끔 증폭된다. 이 단계의 세포를 수집하고 냉동한 다음 이를 이용하여 새로운 증폭 배양물을 파종하는데, 여기서 약 8차례 더 배증하도록 하여 누적 세포 배증 횟수를 약 20회로 한다. 계대 도중의 중간 시점에서 얻은 세포는 후속 증폭 배양을 위하여 1 mL 당 약 100,000 내지 약 1천만 세포, 바람직하게는 1백만 세포 단위로 냉동할 수 있다. 약 20 차례 배증한 세포는 투여 또는 줄기세포 함유 조성물을 제조하기 위하여 1 mL 당 약 1백만에서 약 1억개의 세포에 해당하는 용량의 개별 투여량으로 얼릴 수 있다.
- <175> 한 바람직한 실시 태양에서는 태반을 기증한 기증자(예를 들어 모체)에 대하여 적어도 한 가지 병원체의 존부를 검사하게 된다. 검사 병원체에 대하여 산모가 양성이면 그 태반에서 얻은 전체 릫을 파기한다. 이러한 검사는 태반 줄기세포 릫의 제조 도중 어느 때이건 할 수 있고, 예를 들어 제0 계대 세포의 수립 전후 또는 증폭 배양 도중도 가능하다. 존부를 검사하는 병원체의 예로는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, 사람 면역결핍 바이러스(I형과 II형), 사이토메갈로바이러스, 헤르페스 바이러스 등이 있지만 이들로 제한되는 것은 아니다.
- <176> 6.5. 다발성 경화증의 치료
- <177> 본 발명의 다른 측면에서는 다발성 경화증 또는 다발성 경화증 관련 증상이 있는 환자를 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 환자에게 그 환자의 면역 반응을 조절, 예를 들어 억제하기에 충분한 양의 복수의 태반 줄기세포를 충분한 기간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- <178> 다발성 경화증(MS)은 중추신경계의 만성, 재발성 염증 질환이다. 이 질환은 중추 신경계와 PNS 액손을 감싸는 미엘린 수초와 희소돌기 아교세포 및 신경 세포 자체의 손상을 가져 온다. 이 질환은 자가 반응성 T 세포, 특히 CD4⁺ T 세포가 매개하는데, 이 세포는 세포 부착 분자(adhesion molecule)와 염증 유발(pro-inflammatory) 사이토킨의 영향 아래 증식하고, 혈뇌 장막을 넘어 중추 신경계에 진입한다. 다발성 경화증의 증상은 사지의 감각 장애, 시각 신경 기능 장애, 추체로 기능 장애, 방광 기능 장애, 창자의 기능 장애, 성 기능 장애, 조화 운동 불능과 겹보임을 포함한다.
- <179> 네 가지 다른 임상 경로가 다발성 경화증에서 확인되었다. 첫째인 재발/완화 MS(RRMS)는 며칠 또는 몇 주에 걸쳐 급성으로 나타나는 자기 제한성(self-limiting) 신경 기능 장애의 발작과 이에 이어지는 몇 달에 걸친, 때로 불완전한 회복기로 특징지을 수 있다. 둘째인 2차 진행성 MS(SPMS)는 RRMS로 시작하지만 경로가 바뀌면서 급성 발작과 무관하게 일어나는 지속적인 기능 황폐로 특징지을 수 있다. 셋째인 1차 진행성 MS(PPMS)는 급성 발작 없이 발병시부터 지속적으로 일어나는 기능 저하로 특징지을 수 있다. 넷째인 진행/완화 MS(PRMS)는 진행성 경

로를 따라 시작하지만, 기능 저하의 진행과 간헐적인 발작이 겹쳐 일어난다.

- <180> 다발성 경화증 보유자는 운동 능력 평가, 선택적으로는 MRI를 이용하여 평가한다. 예를 들어 한 운동 능력 평가인 확장된 장애 상태 척도(expanded disability scale)에서는 보유자의 능력을 아래와 같이 순차적으로 점수화한다.
- <181> 0.0 정상적인 신경학적 진단 결과
- <182> 1.0 장애 없음. 한 FS에 최저 수준의 징후
- <183> 1.5 장애 없음. 하나 이상의 FS에 최저 수준의 징후
- <184> 2.0 한 FS에 최저 수준의 장애
- <185> 2.5 한 FS에 사소한 장애 또는 두 FS에 최저 수준의 장애
- <186> 3.0 한 FS에 중간 수준의 장애 또는 세네 FS에 사소한 장애. 완전한 보행 능력.
- <187> 3.5 보행 완전하지만 한 FS에 중간 수준의 장애가 있고 몇몇 FS에 최저 수준보다 심한 장애.
- <188> 4.0 비교적 심한 장애가 있으나 도움 필요 없고 하루에 약 12 시간 정도 스스로 완전한 보행 능력을 가짐. 약 500 미터 정도 도움이나 휴식 없이 걸음.
- <189> 4.5 하루 대부분을 도움 없이 완전한 보행 능력을 가짐. 하루 종일 일할 수 있으며 완전한 활동에는 어떤 제약이 있거나 최저 수준의 도움이 필요할 수 있음. 비교적 심한 장애가 특징적이고 300 미터 정도 도움이나 휴식 없이 걸음.
- <190> 5.0 약 200 미터 정도 도움이나 휴식 없이 걸음. 완전한 일상적 활동(특별한 준비 없이 하루 종일 일할 수 있는 상태)을 하는데 방해가 될 만큼 심한 장애
- <191> 5.5 약 100 미터 정도 도움이나 휴식 없이 걸음. 완전한 일상적 활동을 배제할 만큼 심한 장애.
- <192> 6.0 약 100미터를 휴식 없이 또는 쉬면서 걷는데 간헐적이거나 한 쪽 방향으로 고정적인 도움(지팡이, 목발, 고정기)을 요함.
- <193> 6.5 약 20미터를 휴식 없이 또는 쉬면서 걷는데 양 방향으로 고정적인 도움(지팡이, 목발, 고정기)을 요함.
- <194> 7.0 도움을 받아도 5미터를 넘어 걸을 수 없음. 실질적으로 휠체어에 매임. 표준 휠체어에서는 바퀴질을 혼자 하며 휠체어를 스스로 갈아탈 수 있음. 약 하루 12시간 동안 휠체어 사용 가능.
- <195> 7.5 몇 발자국 이상 걸을 수 없음. 휠체어에 매임. 갈아탈 때 도움이 필요할 수 있음. 스스로 바퀴질을 하지만 표준 휠체어에서 하루 종일 있을 수는 없음. 전동 휠체어가 필요할 수 있음.
- <196> 8.0 실질적으로 의자 또는 침대에 매여 있거나 휠체어로 천천히 돌아다니지만 침대로부터 하루 대부분 일어나 있을 수 있음. 스스로 돌보는 많은 기능을 유지하고 있으며 팔의 사용은 대개 효과적임.
- <197> 8.5 하루 대부분 침대에 매여 있음. 몇 가지는 팔을 효과적으로 사용하며 얼마간 스스로를 돌보는 기능이 있음.
- <198> 9.0 침대를 떠날 수 없음. 대화와 식사가 가능.
- <199> 9.5 가망 없는 침상 위의 환자. 효과적인 대화할 수 없거나 먹고 삼킬 수 없음.
- <200> 10.0 다발성 경화증으로 인한 사망.
- <201> 이 점수 체계에서 "FS"는 측정 대상인 여덟 가지 기능 체계(functional system)를 가리키는데, 추체계, 소뇌계, 뇌간계, 감각계, 대소장과 방광계, 시각계, 대뇌계와 기타 계를 포함한다.
- <202> 다른 유사한 평가 체계도 알려져 있는데, Scripps 신경학적 평가 척도, 보행성 지표, 다발성 경화증 기능 복합 평가(MSFC) 등이 있다.
- <203> 다발성 경화증의 진행은 발작 빈도를 측정함으로써 평가할 수도 있다.
- <204> 다발성 경화증의 진행은 자기 공명 영상법을 이용하여 평가할 수도 있는데, 여기서는 다발성 경화증과 관련된 신경 손상(예를 들어 새로운 손상, 인헨싱 뇌 결절(enhancing brain nodule) 또는 통합 고유 활성 손상(combined unique active lesion))을 검출할 수 있다.

- <205> 따라서 본 발명의 한 실시 태양에서는 다발성 경화증을 가지는 개인, 예를 들어 다발성 경화증 진단을 받은 개인을 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 개인의 면역 반응을 억제하기에 충분한 수의 복수의 태반 줄기세포를 상기 개인에게 투여하는 단계를 포함한다. 한 특정 실시 태양에서 상기 투여는 이 개인의 다발성 경화증 증상을 하나 이상 측정 가능한 정도로 개선한다. 더 특정한 실시 태양에서 이 증상은 예를 들어, 사지의 하나 이상의 감각 장애, 시각 신경 기능 장애, 추체로 기능 장애, 방광 기능 장애, 창자 기능 장애, 성 기능 장애, 조화 운동 불능 및 겹보임이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 투여는 EDSS 척도에서 적어도 1.5점 이상의 점수 향상을 가져온다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 투여는 EDSS 척도에서 2점 이상의 점수 향상을 가져온다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 투여는 다발성 경화증 평가 척도 또는 자기 공명 영상법상으로 측정 가능한 증상 완화를 가져 온다.
- <206> 다발성 경화증에 대하여 다른 치료제를 시도한 바 있다. 예를 들어 IFN β -1a와 IFN β -1b를 포함한 인터페론 베타 등의 면역 조절제 또는 면역 억제제, 아세트산글리아트리아머(Copaxone), 사이클로포스파미드, 메토타렉세이트, 아자티오프린(Imuran), 클라드리빈(Leustatin), 사이클로스포린, 미톡산트론 등이다. 다발성 경화증에 대하여 부신피질자극호르몬(ACTH), 메틸프레드니솔론, 텍사메타손 등을 포함하는 당질 코르티코이드와 같은 항염증 치료제를 시도한 적도 있다. 다발성 경화증에 대해서는 정맥하 면역 글로불린, 혈장 교환술 또는 술파살라진(sulfasalazine) 등의 기타 치료제를 시도한 바도 있다.
- <207> 따라서 본 발명은 나아가 다발성 경화증을 가지는 개인, 예를 들어 다발성 경화증 진단을 받은 개인을 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 개인의 면역 반응을 억제하기에 충분한 수의 복수의 태반 줄기세포 및 하나 이상의 치료제를 상기 개인에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 투여는 상기 개인의 다발성 경화증의 하나 이상의 증상을 측정 가능한 수준으로 개선한다. 한 실시 태양에서 이 치료제는 당질 코르티코이드이다. 한 특정한 실시 태양에서 이 당질 코르티코이드는 부신피질 자극호르몬, 메틸프레드니솔론 또는 텍사메타손이다. 다른 실시 태양에서 이 치료제는 면역 조절제 또는 면역 억제제이다. 많은 특정 실시 태양에서 이 면역 억제제 또는 면역 조절제는 IFN β -1a, IFN β -1b, 아세트산글리아트리아머, 사이클로포스파미드, 메토타렉세이트, 아자티오프린, 클라드리빈, 사이클로스포린 또는 미톡산트론이다. 다른 실시 태양에서 이 치료제는 정맥하 면역 글로불린, 혈장 교환술 또는 술파살라진이다. 다른 실시 태양에서 이 개인은 상기 치료제의 모든 조합을 투여받을 수 있다.
- <208> 다발성 경화증의 진행 중 어느 시점에서라도 다발성 경화증을 가지는 개인, 예를 들어 다발성 경화증 진단을 받은 개인은 복수의 태반 줄기세포 치료를 받을 수 있고, 선택적으로는 하나 이상의 치료제도 투여받을 수 있다. 예를 들어, 이 개인은 진단 후 곧바로, 혹은 진단을 받은 시점으로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6 일내에, 혹은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50주 또는 더 오랜 기간 안에, 혹은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10년 또는 더 오랜 기간 안에 치료를 받을 수 있다. 이 개인은 병의 임상 경과 도중에 한 번 또는 여러 번 치료받을 수 있다. 이 개인은 적절할 경우 급성 발작 도중, 증상 완화시 또는 만성 퇴행기 도중에 치료받을 수 있다. 다른 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포를 다발성 경화증을 앓고 있는 여성에게 분만 후에 투여하여, 임신 도중 경험한 증상 완화 또는 재발 빈도 감소를 유지할 수 있다.
- <209> 한 실시 태양에서는 이 개인에게 약 3억개의 태반 줄기세포를 투여한다. 투여량은 그러나, 체중 등의 상기 개인의 신체적 특성에 따라 달라질 수 있어서, 투여량은 1회 투여 당 태반 줄기세포 1백만 내지 100 억개, 바람직하게는 1000만개와 10억개 사이, 또는 태반 줄기세포 5천만개와 1억개 사이 범위에 포함될 수 있다. 이러한 투여는 정맥 투여가 바람직하지만 살아있는 세포를 투여하는데 있어서 종래 기술에서 인정받은 어떠한 경로를 사용하여도 좋다. 한 실시 태양에서는 세포 은행에서 구한 태반 줄기세포를 사용한다.

실시예

<212> 실시예 1: 희소돌기 아교세포 유지 배지

- <213> 희소돌기 아교세포의 유지를 위한 대표적 배지는 아래와 같다. 바람직한 배지는 설치류 OL 계통 세포의 유지에 최적화된 무혈청 제형이다. 기저 배지(R1236)는 1 mM 피루브산나트륨, 항생제(페니실린-스트렙토마이신), 0.05 μ g/mL 인슐린(포도당 전달체(transporter)를 자극하기 위하여), 100 μ g/mL 트랜스페린(철 흡수), 30 nM 셀렌(대사 보조인자), 10 μ M 포르스콜린(forskolin)(cAMP 용), 60 μ g/mL N-아세틸시스테인(산화-환원, 생존용)과 5 μ g/mL 소 혈청 알부민(담체 단백질)이 보강된 고농도 포도당 DMEM을 포함한다. 설치류 희소돌기 아교세포 전구 세포는 증식과 자가 재생을 촉진하기 위하여 분열 촉진 물질(mitogen)이 보강된 R1236(10 ng/mL PDGF-AA와 5 ng/mL FGF2 또는 20% v:v B104 조건 배지) 속에서 유지된다. 희소돌기 아교세포의 분화를 촉진하기 위하여, 분

열 촉진 물질 함유 배지는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 소 인슐린과 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ T3(트리요오드화트레오닌)가 함유된 R1236으로 바뀌는데, 인슐린과 T3는 모두 설치류 희소돌기 아교세포의 생존과 성숙 인자들이다. 상기 배지 속에 포함된 모든 성장 인자는 재조합 (사람) 폴리펩티드(R&D Inc.사)이고, B104 조건 배지는 신경 모세포종 세포(ATCC에서 구할 수 있음)를 50% 세포 함유 조건까지 배양한 다음 R1236에 48시간 동안 노출시켜 준비할 수 있다. 이 조건 배지를 이어서 여과하고, 나누어 -30°C 에서 사용할 때까지 저장한다. B104는 Salk 연구소의 Dave Schubert에 의하여 수립된 많은 신경 세포주의 하나(Schubert 외, *Nature* 249:224~227(1974))이고, 설치류 희소돌기 아교세포 전구세포의 생존과 자가 재생을 돕는 인자들을 분비한다.

<214> 실시예 2: 효소 소화에 의하여 태반으로부터 줄기세포를 얻는 방법

<215> 효소 소화에 의하여 태반 조직에서 줄기세포를 얻는 예시 방법은 다음과 같다. 냉동 태반 조직(대략 $1 \times 1 \times 0.5$ cm 크기 조각 세 개)을 먼저 입수한다. 이 조직은 탯줄, 태반의 모체쪽 면 또는 양막이다. 쓰인 소화 효소로는 트립신-EDTA(0.25%, GIBCO BRL사), 콜라겐 분해효소 IA(Sigma), 콜라겐 분해효소 I(Worthington사), 콜라겐 분해효소 1A (Sigma)+트립신-EDTA, 콜라겐 분해효소 1(Worthington)+트립신-EDTA 또는 엘라스타제+콜라겐 분해효소 I+콜라겐 분해효소 IV+다스파제(Daspase, Worthington사)가 포함된다. 태반 조직의 소화는 다음과 같이 이루어졌다. 조직을 37°C 에서 분당 250 회전으로 1시간 동안 흔들어주면서(미국 뉴저지주 에디슨 소재 New Brunswick Scientific의 C25 Incubator Shaker) 효소의 존재하에서 잘게 썰었다(50 mL 튜브 속에서 1 g을 10 mL에). 이 상청액을 이어 폐기하였다. 조직의 펠렛을 5% FCS가 보강된 20 mL Hank 배지로 세척(3 회)하고, 배양 배지 12 mL 속에 재현탁하였다. 이 현탁액 3 mL씩을 10 mL 배양 배지가 담겨 있는 T-75 플라스크로 옮겼다(조직 소화 실험마다 플라스크 4개). 혹은 30분 동안 10 mL 트립신/EDTA을 37°C 에서 분당 250 회전으로 흔들어주면서 가하고, 다시 원심분리한 다음 5% FCS가 보강된 10 mL Hank 배지로 추가 세척하였다. 세포를 배지 위에 발라준 다음 배양하고 부착세포를 선별하였다.

<216> 실시예 3: 희소돌기 아교세포 전구세포 계통의 분석

<217> 희소돌기 아교세포 전구세포(oligodendrocyte progenitor cell, OPC)의 출현, 성숙과 분화는 면역화학과 전사물 발현 분석에 의하여 관측할 수 있다. 면역화학 분석에서는 커버 글라스 위에서 자라고 있는 세포를 특정 농도의 성장 인자를 함유하는 배양 배지 속에서 배양한다. 1~7일 후 커버 글라스를 들어내고 4% 파라포름알데히드로 고정한 다음 세포 계통 특이적 항체(표 1)로 특성을 분석하였다. 염색된 세포는 형광 표지(Molecular Probes Inc.사의 Alexa Fluor)가 결합되어 있는 2차 항체를 이용하여 형광 현미경으로 검출하였다. 2차 항체만을 가지는 시료는 음성 대조군으로 삼았다. 면역 반응성이 있는 세포 비율은 커버 글라스마다 200개까지의 세포를 셈으로써 측정하였다.

표 1

<218> 면역조직화학 시약

위치 : 항체	특이성	표적	항체입수	참고문헌
SC: 네스틴	Ms IgG	필라멘트	DSHB	Johe 외, 1996
NP: e-NCAM	MsIgG	필라멘트	DSHB	
NP: A2B5	MsIgM	갱글리오시드	조건배지	Eisenbarth (ATCC) 외, 1979
OC: Olig2	토끼 IgG	bHLH 인자	(H. Yakoo 일본)	Sun 외, 2001
NG2	토끼 IgG	프로테오글리칸	Chemicon	Nishiyama 외, 1996
Pdgfra	염소 IgG	PDGF 수용체	R&D Inc.	Matsui 외, 1989
Unc5b	염소 IgG	네트린 수용체	R&D Inc.	Lu 외, 2004
O4	Ms IgG	수퍼티드	CM	Bansal 외, 1989
OC: O1	Ms IgG	GalC	CM	Raff 외, 1978

- <229> CNPase Ms IgG 미엘린 Sigma Pfeiffer 외, 1993
- <230> MBP 토끼 IgG CNPase Chemicon Inc. "
- <231> 염기성 미엘린
- <232> **뉴런:** NF-H 신경 섬유 Virginia Lee
- <233> **별아교세포:** GFAP 토끼 IgG 신경교 사상체 "
- <234> 면역 조직화학 분석은 특정 배양 조건하에서의 전사물 발현 분석을 통하여 보충될 수 있다. RNA 분석에는 노턴 흡입법(McKinnon 외, 1990)과 역전사 중합효소 연쇄 반응(McKinnon 외, 1993b)을 이용하였다. 60 mm 플레이트에서 자라고 있는 세포를 회수한 다음 TRIzol 시약(Gibco사)를 이용하여 RNA를 거두어 들었다. 역전사 중합효소 연쇄 반응에서는 RNA 1 μ g을 cDNA로 역전사(MoMuLV 역전사 효소, cDNA 수득률은 1:1)하여 분석한다. 이어서 cDNA 50~100 ng을 Taq 중합효소와 합성 프라이머를 이용한 PCR 증폭의 주형으로 사용하는데, 이 프라이머들은 앞서 기술한 프라이머 선택 프로그램(Primer Selection Program)(예를 들어 McKinnon 외, *Glia* 7:245-254(1993)를 보라)을 이용하여 선택하였다. 프라이머는 회소돌기 아교세포와 회소돌기 아교세포 전구세포 계통 특이적 단백질을 암호화하는 전사체에 혼성화하도록 만들어졌다. 새 프라이머 쌍에 대해서는 온도 구배($\pm 10^{\circ}\text{C}$)를 이용하여 최적의 증폭 파라미터를 결정한다. 연쇄 반응 조각들을 전기영동으로 분리하고, 브롬화 에티듐 염색으로 관찰한 다음, 자동 DNA 서열 분석으로 정체를 확인하였다(DNA 분석 시설(core facility)).
- <235> **실시예 4: 증식, 이동과 생존 분석**
- <236> 증식 분석: 회소돌기 아교세포 전구세포가 특정 리간드에 대하여 세포 분열 촉진 반응(mitogenic response)을 일으키는 능력이 있는지를 정량적 ^3H -티미딘 흡수 분석법으로 살펴 보았다. 세포를 FGF와 PDGF에 대한 최대 반응을 포함하는 농도 범위로 성장 인자에 노출시켜 최대 절반 반응(half maximal response)값을 측정하였다. 반응값 범위는 배경값인 500~1000 cpm(성장 인자 없음)으로부터 10,000 cpm(재조합 PDGF-AA)에 이르는데, 이 분석법은 부분적 분열 촉진 반응을 정확히 검출할 만큼 충분히 정확하다. 한편으로 모든 세포 증식 분석은 적어도 세 번 별도로 측정할 수도 있다. 정성적인 분석을 위해서는 세포를 분열 촉진 물질과 50 μM BrdU(Sigma사)에 마지막 4시간 동안 노출시키고, BrdU에 대한 이중 면역 형광 분석(Osterhout 외, *J. Neurosci.* 17:9122-9132 (1997))과 2차 세포계통 표지를 이용하여 DNA 합성을 관찰한다.
- <237> 증식 분석은 DNA 합성의 배경값(background level)을 줄이기 위하여 재조합 성장 인자에 노출시키기 전에 분열 촉진 물질로부터 24시간 동안 분리한 세포를 대상으로 수행한다. 본 명세서에서 기재하는 증식 분석은 분열 촉진 물질에 응답하여 일어나는 DNA 합성 증가를 측정하는데, 이 분석의 마지막 4시간 동안 일어나는 ^3H -티미딘의 흡수는 성장 인자에 대한 노출 여부에 의존하게 된다. 96웰 플레이트 속의 세포(웰 당 세포 2000개)를 성장 인자가 없는 R1236 배지 속에서 24시간 동안 배양한 다음, 특정 농도로 성장 인자를 함유하는 조건 하에서 다시 24시간 동안 배양하는데, 여기서 마지막 4시간은 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ^3H -티미딘과 함께 배양한다. 자동 수확기(Brandel사의 automatic harvester)를 이용하여 핵산을 회수하고 흡수된 방사능을 섬광 계수법으로 측정한다. 하나의 성장 인자 농도마다 분석을 세 차례(세 개의 웰) 수행한다.
- <238> 이동 분석: 회소돌기 아교세포 전구세포의 이동 능력(화학 주성)과 성장 인자 노출시 이 세포의 방향성 반응(directional response)은 영상 촬영으로 측정하였다. 정량 분석으로는 변형 Boyden 체임버 분석법(Armstrong 외, 1990)을 사용하였다. 이 분석법에서는 화학 주성 체임버의 위쪽과 아래쪽 웰 모두에 화학 주성 물질을 가함으로써(이렇게 하면 화학주성이 없어지지만 화학 역동 현상은 없어지지 않음) PDGF-AA 매개 화학 주성(4000 세포/ mm^2)을 세포 이동의 배경값(1000 세포/ mm^2)과 화학 역동 현상(chemokinesis, 무작위적인 운동성)으로부터 구별할 수 있다(Armstrong 외, *J. Neurosci. Res.* 27:400~407(1990)을 보라).
- <239> 세포를 분열 촉진 물질이 없는 배지 속에서 16시간 동안 배양한 다음, 한정 배지(defined medium) 속에 담아 미세화학 주성 체임버의 꼭대기 웰로 옮기는데(웰 당 세포 20,000개), 이 체임버에는 폴리카보네이트 필터가 있어서 배지와 화학 주성 물질을 함유하는 아래쪽 체임버로부터 세포를 떼어 놓는다. 매 성장 인자 농도마다 3개의 웰을 사용하여 실험하는데, 세포를 16시간 동안 37°C 에서 배양한다. 상기 필터의 아래쪽 면으로 매 mm^2 넓이마다 이동한 세포의 수를 GFP 결합 세포 수를 세어 측정하고, 이 막을 Dip-Quik(American Scientific사)으로 염색하여 총 이동량을 측정한다.
- <240> 생존 분석: 개별 회소돌기 아교세포 전구세포의 생존은 MTT 분석법(Mosmann, 1983)과 변형 TUNEL 분석법

(Gavrieli 외, *J. Cell. Biol.* 119:493~501(1992))을 이용하는 염색질 토막내기(chromatin fragmentation, 뉴클레오솜 사다리 형성(nucleosome laddering))로 측정하는데, 이는 Yasuda 외, *J. Neurosci. Res.* 40:306~317(1995)에 기재되어 있다. 세포를 24시간 동안 bFGF, PDGF-AA 함유 배지 혹은 성장 인자가 없는 배지 속에서 배양한 다음 MTT를 흡수하는 세포의 수 또는 새깁는 말단 표지(nick end labeling) 정도를 돌연변이 회소돌기 아교세포 배양과 야생형 회소돌기 아교세포 배양 경우에 서로 비교한다. PI3K 억제제인 워트만닌을 세포 사멸의 양성 대조군(Ebner 외, *J. Neurosci. Res.* 62:336~345(2000))으로 삼는다.

<241> 이러한 MTT 분석법은 96 웰 플레이트 속에서 자라고 있는 세포를 대상으로 하며, 표지된 세포의 비율은 전술한 바(Barres 외, *Cell* 70:31~46(1992))와 같이 염색된 세포 수를 세어 측정할 수 있다. bFGF와 PDGF-AA가 DNA 토막내기를 방지하는 능력은 이들 성장 인자의 농도를 높여가며 배양한 조건에서 자라는 세포와 성장 μ 인자의 부재하에서 자라는 세포의 염색질 DNA를 분석함으로써 알아볼 수 있다. 정량 분석을 위해서는 96웰 플레이트 속에서 자라고 있는 세포를 4 단위의 말단 전달 효소(terminal transferase, Promega Biotech사), 2 μ Ci의 [α - 32 P]-디데옥시 ATP(Amersham사)와 0.3% Triton X-100을 함유한 PBS 속에서 37℃로 60 분 동안 배양한 다음, 세포 용해질(lysate)을 Whatman GF/C 거름종이 위에 수확하고(Brandel사의 Cell Harvester) DNA 3'-말단의 32 P 흡수율을 액체 섬광 계수법으로 측정한다. 이 분석법의 결과는 효소에 의존하며, 배경값으로 10,000 cpm이 관측되고, 1 μ M의 스타우로스포린(Ebner, 2000)의 존재 하에서 72시간 동안 배양한 세포는 100,000 cpm의 방사능을 흡수한다. 뉴클레오솜 사다리 형성의 정성 분석을 위해서는 35 mm 접시에서 자라고 있는 세포로부터 DNA를 분리하고 그 말단을 32 P-ddATP와 말단 전달 효소로 시험관내에서 표지한 다음, 아가로스 겔에서 크기에 따라 분리하여 뉴클레오솜 크기의 토막들을 분리한다. 그리고 방사능 흡수 정도를 음영 계측법으로 측정한다.

<242> 실시예 5: 흐름 세포 측정법

<243> 흐름 세포 측정을 위한 세포내 염색을 위해서 대략 5×10^5 개의 태반 유래 줄기세포를 15분 동안 0.5 mL의 Beckman Coulter IntraPrep 시약을 이용하여 투과성으로 만든다. 이 세포를 PBS로 행구어 준 다음, 얼음 속에서 30 분 동안 1차 항체(1 g)와 배양한 다음, 두 번 세척한다. 세포에 1:100 비율로 2차 항체 용액을 현탁한 다음, 30분 동안 배양한다. 염색 후 세포를 두 차례 세척하고 곧바로 Beckman Coulter XL-MCL 흐름 측정 장치로 분석한다. IBMX 유도 세포와 미처리 세포의 단백질 발현을 평가하기 위하여 $1.5 \times 10 \times 10^4$ 개의 세포를 FL1(FITC)과 FL2(Cy3) 신호를 이용하여 수집한다. 죽은 세포와 파편은 고산란성 정방향 직교 방향 광 산란 윈도우(high forward and orthogonal light scatter window)를 이용하거나 프로피듐 요오드(PI) 배제법을 이용하여 제거한다.

<244> 마우스, 토끼, 당나귀의 1차 항체들과 그 최종 희석률은 아래와 같다. 토끼 항-네스틴(nestin)은 1:100(BD PharMingen), 마우스 항뉴런특이적 에놀라제는 1:100(Chemicon); 마우스 항미엘린/회소돌기 아교세포 특이적 단백질은 1:100(DAKO), 마우스 항신경섬유 L은 1:100(DAKO), 토끼 항신경교원섬유산단백질(膠原纖維酸蛋白質, glial fibrillary acidic protein)은 1:200(DAKO), 마우스 항비메틴은 1:100(BD PharMingen). 흐름 세포 측정 실험에서 쓰이는 다음 항체들은 Becton Dickinson사로부터 구할 수 있고, 1:10 희석 비율로 사용된다: 항CD45, 항CD34, 항CD29, 항CD10, 항HLA-1, 항CD54, 항CD90, 항SH2와 항SH3.

<245> 세포는 폴리오르니틴 피복 커버 글라스(Sigma사) 위 10% FCS 함유 DMEM 속에서 배양한다. 4% 파라포름알데히드 함유 PBS로 10분 동안 세포를 고정하고, 0.2% 트리톤 X-100 함유 PBS로 실온에서 세포를 투과성으로 만든다. 세포를 이어서 1차 항체와 37℃에서 30 분 동안 배양한다. PBS로 3회 세척하고 나서 세포를 플루오레세인(FITC)-결합 당나귀 항마우스 IgG(Jackson Laboratories사) 아니면 Cy3-결합 염소 항토끼 IgG(Jackson Laboratories사)와 함께 (두 경우 모두) 1:50 희석률로 37℃에서 30분 동안 어둠 속에서 배양한다. 표지된 세포를 세척하고, 이 세포를 Vectashield 마운팅 매질(Vector Laboratories사)로 마운트한다.

도면의 간단한 설명

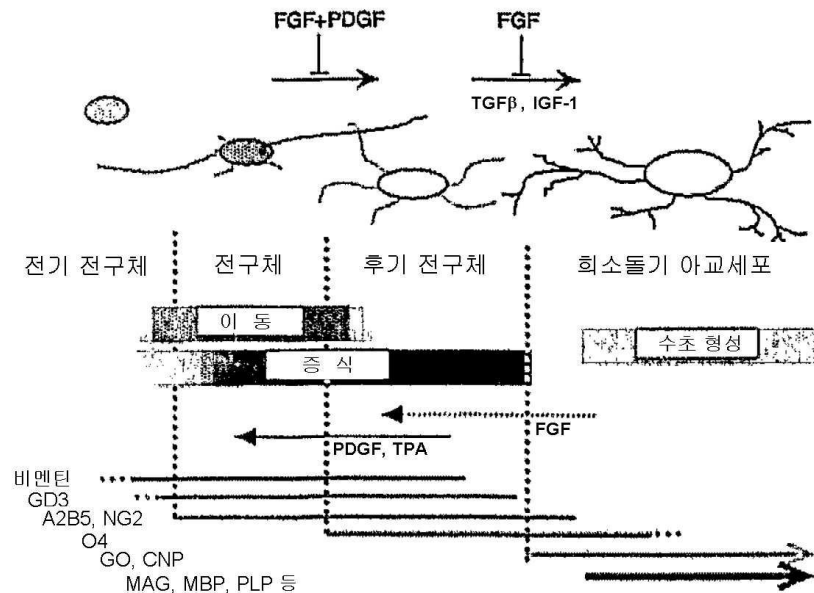
<210> 도 1: 회소돌기 아교세포 전구세포의 성숙(McMorris와 McKinnon, *Brain Pathology* 6:313~329(1996)). 시간에 따라 항원이 나타나는 것은 이동성인 "초기(early)"(O2A) 전구세포로부터 비이동성 "후기(late)"(O4, pro-OLblast)와 체세포분열 후 OL로의 진행을 표시한다. 세포의 성숙은 표시된 인자에 의해서 가역적으로 억제(?)되거나, 역방향으로 전환(?)될 수 있다. 단일클론 항체와 표적 항원은 표 1에 정리하였다.

<211> 도 2: 사람 태반 줄기세포. 왼쪽: 1차 배양에서 형성된 태반 줄기세포 콜로니. 오른쪽: 이소부틸메틸크산틴

(IBMX, 아데노신 작용제 활성화도 가지는 인산디에스테르 가수분해효소의 비특이적 억제제)으로 처리한 태반 줄기 세포. 면역 염색 덕분에 신경 줄기세포 표지(비멘틴, GFAP, 네스틴)를 포함하는 신경 계통(neural lineage) 표지의 존재뿐 아니라 신경세포(neuronal) 계통(신경 섬유, 뉴런 특이적 에놀라제)과 아교세포(glial) 계통(미엘린 희소돌기 아교세포 특이적 단백질(MOSP))의 표지 또한 관찰할 수 있다.

도면

도면1



도면2

