



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0109127
 (43) 공개일자 2009년10월19일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>C12N 5/08</i> (2006.01) <i>A01K 67/027</i> (2006.01)
 <i>A61P 1/16</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7018748
 (22) 출원일자 2008년02월12일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2009년09월08일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2008/001830
 (87) 국제공개번호 WO 2008/100497
 국제공개일자 2008년08월21일</p> <p>(30) 우선권주장
 60/901,066 2007년02월12일 미국(US)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 안트로제네시스 코퍼레이션
 미국 뉴저지주 07927 세다 놀스 호스힐 로드 45</p> <p>(72) 발명자
 에딘저, 제임스, 더블유.
 미국, 뉴저지 07718, 벨포드, 273 레오나르드빌레 로드
 하리리, 로버트, 제이.
 미국, 뉴저지 07932, 플로르함 파크, 5 헤리타지 로드
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인필앤은지</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 부착성 태반 줄기세포에서 유래한 간세포와 연골세포 및 CD34+, CD45- 태반 줄기세포가 농축된 세포군

(57) 요약

본 명세서에서는 태반 줄기세포로부터 간세포를 생산하기 위한 방법과 조성물을 제공한다. 나아가 본 명세서에서는 이러한 간세포를 이용하여 간의, 예를 들어 외상, 염증 및 퇴행성 장애를 치료하고 시술하는 용도를 제공한다. 또한 본 명세서에서는 나노섬유 스캐폴드(nanofibrous scaffold)와 부착성 태반 줄기세포의 조합에 관련된 방법과 조성물을 제공하고, 이들을 연골 복구에 이용하는 방법을 제공한다. 마지막으로 본 명세서에서는 태반 유래의 비부착성 CD34⁺CD45⁻ 줄기세포에 관련된 조성물과 방법을 제공한다.

<p>(72) 발명자</p> <p>왕, 지아-룬 미국, 뉴저지 08003, 체리 힐, 212 래빗 런 로드</p> <p>예, 귀안 미국, 뉴저지 07039, 리빙스톤, 10 마운트 하벤 드 라이브</p> <p>페레이라, 마리안 미국, 뉴저지 07016, 크랜포드, 8 모화 드라이브</p> <p>에브람손, 사스차, 다운 미국, 뉴저지 08844, 힐스보로우, 609에이 말보로우 컵언</p> <p>라바조, 크리스텐, 에스. 미국, 뉴저지 07081, 스프링필드, 50 뉴브룩 레인</p>	<p>(30) 우선권주장</p> <p>60/901,076 2007년02월12일 미국(US)</p> <p>60/905,664 2007년03월07일 미국(US)</p> <p>60/906,064 2007년03월08일 미국(US)</p> <p>60/966,577 2007년08월28일 미국(US)</p>
---	---

특허청구의 범위

청구항 1

CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺인 태반 줄기세포를 부티르산나트륨(sodium butyrate)에 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 접촉은 상기 줄기세포가 간세포의 특성을 나타내기에 충분한 조건과 시간 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는 간세포의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 특성은 미분화 태반줄기세포와 비교하였을 때 탈시알기당단백질 수용체(asialoglycoprotein receptor), 알파-1-안티트립신, 알부민, 사이토크롬 P450 활성의 생성 또는 사이토케라틴 18(cytokeratin 18)의 생산량 증가인 것을 특징으로 하는 간세포의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양은 상기 줄기세포를 알긴산-폴리-L-리신(alginate-poly-L-lysine) 속에 캡슐화(encapsulation)하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 간세포의 제조 방법.

청구항 4

제1항의 방법에 따라 제조한 간세포 또는 간세포성 세포(hepatocytic cell).

청구항 5

제4항의 간세포 또는 간세포성 세포를 간의 염증과 관련된 질병, 장애 또는 상태를 가진 환자에 도입하는 단계를 포함하는, 간의 염증과 관련된 질병, 장애 또는 상태를 치료하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 질병, 장애 또는 상태는 간경화 또는 바이러스 감염인 것이 특징으로 하는 방법.

청구항 7

- a. 마우스에 내재하는 실질적으로 모든 골수 세포를 죽이기에 충분한 감마선으로 상기 마우스를 조사하는 단계,
 - b. NOD/SCID 마우스에서 유래한 골수 또는 골수 유래 줄기세포를 a 단계의 마우스에게 투여하여 a 단계 마우스의 조혈계(hematopoietic system)를 재건하는 단계 및
 - c. CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺인 복수의 태반 줄기세포로부터 분화된 복수의 간세포 또는 간형성성 세포를 상기 마우스에게 이식하는 단계를 포함하는 방법에 따라 제조되며,
- 사람 태반 줄기세포 유래 간세포 또는 간형성성(hepatogenic) 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 태반 줄기세포는 사이토케라틴 18⁺이기도 한 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 간세포 또는 간형성성 세포를 마우스의 췌장조직에 투여하는 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 간세포 또는 간형성성 세포는 바이러스에 감염된 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 바이러스는 A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스 또는 E형 간염 바이러스인 것을 특징으로 하는 마우스.

청구항 12

제12항의 마우스를 관심 대상 화합물에 접촉하는 단계를 포함하는 항바이러스제의 확인 방법으로서,

상기 마우스의 혈청은 바이러스를 검출 가능한 양으로 지니고 있고, 상기 접촉이 상기 관심 대상 화합물에 접촉하지 않은 마우스의 혈청과 비교하였을 때 상기 마우스 혈청 속 바이러스의 양을 검출 가능하게 줄여주면 상기 화합물이 항바이러스제인 것을 특징으로 하는 항바이러스제의 확인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 바이러스는 A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스 또는 E형 간염 바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스제의 확인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 바이러스의 항원을 검출하는 것을 특징으로 하는 항바이러스제의 확인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 바이러스의 핵산을 검출하는 것을 특징으로 하는 항바이러스제의 확인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 바이러스는 B형 간염 바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스제의 확인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 항원은 HBeAg 또는 HBsAg인 것을 특징으로 하는 항바이러스제의 확인 방법.

청구항 18

알지네이트(alginate) 속에 캡슐화된(encapsulated) 복수의 세포를 함유하는 조성물로서,

상기 세포가 태반 줄기세포로부터 분화된 것이고, 또한 이들 세포가 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺인 부착성 태반 줄기세포에서 발현하지 않거나, 이러한 태반 줄기세포와 검출 가능하게 다른 정도로 간세포의 표지(marker)를 적어도 하나 발현하고 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,
상기 알지네이트는 비드 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,
상기 비드는 그 크기가 약 200 μm 내지 약 800 μm 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,
상기 비드는 평균 크기가 약 500 μm 인 것을 특징으로 하는 조성물..

청구항 22

CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺인 분리된 부착성 태반 줄기세포와 전기 방사 나노섬유 스캐폴드(electrospun nanofibrous scaffold)를 함유하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서,
상기 나노섬유 스캐폴드가 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리락트산글리콜산(poly lactic glycolic acid, PLGA), 제I형 콜라겐, 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE), 폴리(카프롤락톤), 폴리(L-락타이드-공중합- ϵ -카프롤락톤)[P(LLA-CL)](예를 들어 75:25) 및/또는 폴리(3-히드록시부티르산-공중합-3-히드록시발레르산)(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)와 제I형 콜라겐의 공중합체로 된 섬유를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서,
상기 나노섬유 스캐폴드는 두께가 평균 약 250 나노미터 내지 약 10 μm 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 25

제22항에 있어서,
상기 줄기세포가 연골발생(chondrogenic) 세포나 연골세포로 분화하는 조건 하에서 상기 조성물을 접촉하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 26

조성물의 제조 방법에 있어서,
CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺인 부착성 태반 줄기세포에 전기방사 나노섬유 스캐폴드를 접촉하는 단계를 포함하고,
상기 나노섬유 스캐폴드는 PLLA 또는 PLGA를 약 20 kV로 바늘과 수집기(collector) 사이 거리 약 30 cm에서, 분당 약 0.05 mL 내지 분당 약 0.1 mL의 유속으로 전기방사(electrospin)하여 제조하며, 상기 PLLA 또는 PLGA는 약 10% w/w 내지 약 20% w/w로 용액 속에 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물의 제조 방법.

청구항 27

CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 농축된(enriched) 분리된 세포군.

청구항 28

제22항에 있어서,

상기 세포군 속 세포의 적어도 50%가 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 29

제22항에 있어서,

상기 세포군 속 세포의 적어도 70%가 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 30

제27항에 있어서,

상기 세포군 속 세포의 적어도 90%가 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 31

제27항에 있어서,

상기 세포군은 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것이 아닌 줄기세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것이 아닌 줄기세포가 $CD34^-$ 부착성 태반 줄기세포인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 부착성 태반 줄기세포가 $CD200^+$, $CD105^+$, $CD90^+$, $CD10^+$, $CD34^-$ 이고 $CD45^-$ 인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 34

제31항에 있어서,

상기 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것이 아닌 줄기세포가 골수 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 35

제31항에 있어서,

상기 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것이 아닌 줄기세포가 $CD34^+$, $CD45^+$ 조혈 줄기세포인 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 36

제8항에 있어서,

상기 $CD34^+$ 이고 $CD45^-$ 인 것이 아닌 줄기세포가 제대혈 또는 태반 혈액 속에 포함된 것을 특징으로 하는 분리된 세포군.

청구항 37

$CD34^+$ 인 세포를 태반 세포군 속에서 선별하여 $CD34^+$ 태반 세포군을 형성하는 단계와 상기 $CD34^+$ 태반 세포군에서 $CD45^+$ 세포를 제거하여, $CD34^+$, $CD45^-$ 태반줄기세포군을 형성하는 단계를 포함하는 $CD34^+$, $CD45^-$ 태반 줄기세포군의 제조 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 명세서에서는 태반 유래 줄기세포와 관련된 방법과 조성물을 제공한다. 본 명세서에서는 인간의 부착성 태반 줄기세포에서 간세포를 생산하는 방법과, 이러한 간세포를 이용하여 간의, 예를 들어, 외상, 염증 및 퇴행성 장애를 치료하고 시술하는 용도를 제공한다. 또한 본 명세서에서는 나노섬유 스캐폴드(nanofibrous scaffold)와 부착성 태반 줄기세포의 조합에 관련된 방법과 조성물을 제공하고, 이들을 연골 복구에 이용하는 방법을 제공한다. 마지막으로 본 명세서에서는 태반 유래의 비부착성 CD34⁺CD45⁻ 줄기세포에 관련된 조성물과 방법을 제공한다.

배경기술

<2> 이 출원은 2007년 2월 12일 제출된 미국 예비출원 제60/901,066호, 2007년 2월 12일 제출된 미국 예비출원 제60/901,076호, 2007년 3월 7일 제출된 미국 예비출원 제60/905,664호, 2007년 3월 8일 제출된 미국 예비출원 제60/906,064호와 2007년 8월 28일 제출된 미국 예비출원 제60/966,577호를 기초로 한 우선권을 주장하며, 본 명세서는 인용에 의하여 상기 명세서 내용 전부를 포함하고 있다.

<3> 체세포 줄기세포를 여러 가지 치료 분야, 예를 들어 세포 보충(cell replenishment) 요법의 동물 모형을 비롯한 분야에 사용하자는 제안이 나온 바 있다. 이식한 줄기세포의 치료 잠재력은 윤리적으로 허용할 수 있는 자기 유래 줄기세포원을 구할 수 있고, 줄기세포가 특정 세포 유형으로 성숙하는 과정을 프로그램하는 자기 재생(self renewal)과 세포 운명 결정(fate decision)을 조절할 수 있게 되었을 때만 임상에 쓰일 수 있다.

<4> 배아 줄기세포가 간세포 계통으로 분화하는 과정은 여러 연구 결과에서 설명하였다(예를 들어 Sharma, N.S. 외, *Biotechnology & Bioengineering*, 94(6): 1053-93(2006); Maguire, T. 외, *Biotechnology & Bioengineering*, 93(3):581-591(2006)과 Chen Y. 외, *Cell Transplant.* 2006;15(10):865-71을 보라). 또한 사람 골수 유래 중간엽 세포에 대해서도 제대로 기능하는 간세포로 분화하는 능력이 있는지 조사한 결과 일부 성과가 있었다(Ong SY, Dai H, Leong KW, *Tissue Eng.* 2006년 10월 1일; Ong SY, Dai H, Leong KW *Biomaterials* (22):4087-97 (2006)(전자 출판일 2006년 4월 17일); Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, *Blood.* 106(2):756-63(2005)(전자 출판일 2005 4월 7일).

<5> 간 질환이 이환과 사망의 원인이 되는 경우가 늘어나고 있다. 환경이나 병원체에 의한 간 기능 파괴는 그 밖의 면에서는 건강한 개인들에 대한 중대한 보건상 위험 요소가 된다. 이러한 손상된 장기 속의 손상되거나 죽은 간세포를 대체하는 것은 따라서 중요한 임상적 목표이다. 그러나 간세포로 분화할 수 있는 줄기세포의 윤리적으로 허용할 수 있는 세포원은 현재 구할 수 없는 상태이다. 본 명세서에서는 이러한 수요와 다른 대응하지 못한 수요에 대응한다.

발명의 상세한 설명

<6> 발명의 요약

<7> 본 명세서의 한 측면에서는 부착성 태반 줄기세포로부터 간세포를 생산하는 방법과 그를 위한 조성물 및 이러한 간세포를 이용하여 질병, 장애나 조건을 치료하는 방법을 제공하는데, 여기서 이들은 간의 외상, 염증이나 간의 전신(systemic) 장애에 관련된 것으로서 예를 들어 간의 염증에 관련된 질병, 장애나 조건이다. 본 명세서의 한 실시 태양에서는 간세포의 생산 방법을 제공하는데, 이 방법은 간세포의 특성을 나타내는데 충분한 시간과 조건 하에서 태반 줄기세포를 배양하는 단계를 포함한다. 한 특정 실시 태양에서는 이 특성이 알부민의 생산이나 알부민을 암호화하는 유전자의 발현이다. 다른 어떤 태양에서는 이 특성이 요소의 생산이다. 다른 어떠한 태양에서는 이 배양이 상기 줄기세포를 부티르산나트륨(sodium butyrate)과 접촉시키는 단계를 포함한다. 다른 어떠한 실시 태양에서는 이 배양이 상기 줄기세포를 알긴산-폴리-L-리신(alginate-poly-L-lysine)으로 캡슐화(encapsulating)하는 단계를 포함한다. 본 명세서의 다른 태양에서는 태반 유래 줄기세포가 분화하여 생산한 간세포를 제공한다. 또한 본 명세서에서는 또한 간 기능 이상과 연관된 질병, 장애나 조건을 가지는 대상의 치료 방법을 제공하는데, 이 방법은 그러한 간세포를 상기 대상에 도입하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서는 이 질병, 장애나 조건이 간경화이다. 몇몇 실시 태양에서는 이 질병이나 조건이 예를 알코올이나 버섯의 독소 등을 섭취하여 일어난 간 독성의 결과이다. 몇몇 태양에서는 이 질병이나 조건이 바이러스 감염, 예를 들어 A, B, C, D나 E형 간염의 감염이다. 몇몇 실시 태양에서는 이 질병이나 조건이 전격성 간염(電擊性,

fulminant hepatitis)이나 아(亞)전격성(subfulminant) 간염이다. 본 명세서의 다른 측면에서는 화합물이 간독성 활성을 지니는지를 측정하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 유래 줄기세포의 분화로 생산된 간세포를 그 화합물과 접촉시키는 단계와 이 화합물이 간세포에 독성이 있는지를 측정하는 단계를 포함한다.

- <8> 다른 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포가 사이토케라틴 18(cytokeratin 18)에 대하여 양성이다. 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 사이토케라틴 18에 양성인 세포가 적어도 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%인 태반 줄기세포군 또는 이들로부터 분화된 세포를 제공한다. 본 명세서의 다른 태양에서는 태반 줄기세포나 이 세포로부터 분화된 세포의 적어도 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 사이토케라틴 18에 양성인 태반 줄기세포나 이들로부터 분화된 세포를 포함하는 세포군을 제공한다. 다른 태양에서 본 발명은 태반 줄기세포 또는 태반 줄기세포군 혹은 이들로부터 분화된 세포를 분리하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 사이토케라틴 18⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계와 여타 태반 세포로부터 이 줄기세포를 분리하는 단계를 포함한다.
- <9> 본 명세서의 다른 측면에서는 알긴산(알지네이트, alginate)으로 캡슐화된 복수의 세포를 함유하는 조성물을 제공하는데, 여기서 상기 세포는 태반 줄기세포에서 분화된 것이다. 한 실시 태양에서는 상기 세포가 태반 줄기세포가 발현하지 않는, 또는 측정 가능한 정도의 차이를 가지고 발현하는 간세포의 표지를 적어도 하나 발현한다. 다른 태양에서는 이 알긴산이 비드 형태이다. 어떠한 실시 태양에서는 이 비드가 대략 200 μm 내지 약 800 μm 크기이다. 다른 어떤 태양에서는 이 비드가 평균 500 μm 크기이다.
- <10> 본 명세서의 다른 측면에서는 사람 태반 줄기세포 유래 간세포 또는 간 형성성(hepatogenic) 세포를 함유하는 마우스를 제공하는데, 여기서 이 마우스는 다음 단계들을 포함하는 방법에 따라 생산한다: (a) 상기 마우스에 내재하는 실질적으로 모든 골수 세포를 죽이기에 충분한 감마선으로 상기 마우스를 조사하는 단계, (b) 어느 NOD/SCID 마우스로부터 골수 또는 골수 유래 줄기세포를 상기 마우스의 조혈계(造血系)를 재건하기에 충분한 양으로 상기 마우스에게 투여하는 단계와 (c) 복수의 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD117⁻, CD200⁺ 태반 줄기세포로부터 분화된 복수의 간세포 또는 간 형성성 세포를 상기 마우스에게 이식하는 단계. 한 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포가 또한 사이토케라틴 18⁺이고 분화된 간세포가 발현하는 다른 사이토케라틴 적어도 한 가지에 대하여 음성이다. 다른 태양에서는 상기 간세포 또는 간 형성성 세포를 상기 마우스의 컷바퀴를 통하여 투여한다. 다른 태양에서는 상기 간세포 또는 간 형성성 세포에 바이러스를 감염시킨다. 어떤 실시 태양에서는 이 바이러스가 A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스 또는 E형 간염 바이러스이다. 더 구체적인 태양에서는 이 바이러스가 B형 간염 바이러스이다.
- <11> 본 명세서의 다른 측면에서는 항바이러스제의 판정 방법을 제공하는바, 이 방법은 관심 대상 화합물을 마우스에 접촉하는 단계를 포함하는데, 이때 상기 마우스의 혈청에는 바이러스가 측정 가능한 양으로 존재하고, 상기 접촉에 의하여 상기 마우스의 혈청 속 바이러스의 수가 상기 화합물과 접촉하지 않은 상기 마우스 혈청보다 측정 가능하게 줄어들면 상기 화합물은 항바이러스제인데, 여기서 이 마우스는 다음 단계를 포함하는 방법에 따라 생산한다: a. 상기 마우스에 내재하는 실질적으로 모든 골수 세포를 죽이기에 충분한 감마선으로 상기 마우스를 조사하는 단계, b. 어느 NOD/SCID 마우스로부터 골수 또는 골수 유래 줄기세포를 상기 마우스의 조혈계(造血系)를 재건하기에 충분한 양으로 상기 마우스에게 투여하는 단계와 c. 복수의 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD117⁻, CD200⁺ 태반 줄기세포로부터 분화된 복수의 간세포 또는 간 형성성 세포를 상기 마우스에게 이식하는 단계. 이 방법의 한 실시 태양에서는 상기 바이러스가 A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스 또는 E형 간염 바이러스이다. 이 방법의 어떠한 태양에서는 상기 바이러스의 항원이나 핵산을 검출한다. 더 구체적인 태양에서는 이 바이러스가 B형 간염 바이러스이다. 이 바이러스의 항원을 검출하는 이 방법의 어떠한 태양에서는 이 항원이 HBeAg 또는 HBsAg이다. 이 바이러스의 핵산을 검출하는 다른 특정 태양에서는 이 핵산이 B형 간염 바이러스의 공유결합으로 폐쇄된 원형 핵산이다. 더 구체적인 태양에서는 B형 간염 바이러스의 공유결합으로 폐쇄된 원형 핵산에 특이적인 프라이머를 써서 상기 핵산을 중합효소 연쇄 반응으로 검출한다.
- <12> 본 명세서의 다른 측면에서는 매트릭스와 이러한 매트릭스를 함유하는 조성물을 제공하는데, 여기서 이 매트릭스는 간세포 또는 연골발생(chondrogenic) 세포 계통으로 또는 간세포나 연골세포로 분화된 태반 줄기세포를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서 이 매트릭스는 3차원 스캐폴드이다. 다른 더 구체적인 태양에서는 이 매트릭스가 콜라겐, 젤라틴, 라미닌(laminin), 피브로넥틴, 펙틴, 오르니틴 또는 비트로넥틴(vitronectin)을 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 이 매트릭스가 나노섬유 스캐폴드(nanofibrous scaffold), 예를 들어 전기방사(electrospun) 나노섬유 스캐폴드이거나 이를 포함한다. 더 구체적인 태양에서는 이 나노섬유 스캐폴드가

폴리(L-락트산)(PLLA), 제I형 콜라겐, 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE), 폴리(카프롤락톤), 폴리(L-락타이드-공중합-ε-카프롤락톤)[P(LLA-CL)](예를 들어 75:25) 및/또는 폴리(3-히드록시부티르산-공중합-3-히드록시발레르산)(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)와 제I형 콜라겐의 공중합체를 함유한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 전기 방사 나노섬유 스캐폴드가 태반 줄기세포가 연골세포나 간세포로 분화하는 것을 촉진한다. 다른 어떠한 실시 태양에서는 이 전기 방사 나노섬유 매트릭스나 스캐폴드가 연골세포성 세포 및/또는 연골세포, 혹은 간세포성 세포 및/또는 간세포로 분화한 태반 줄기세포를 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 이 매트릭스가 양막 또는 양막 유래 생체 소재이다. 다른 더 구체적인 태양에서는 이 매트릭스가 세포외 막단백질을 함유한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 매트릭스가 합성 화합물을 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 매트릭스가 생활성 화합물을 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 생활성 화합물이 성장 인자, 사이토킨, 항체 또는 5000 돌턴 미만의 유기 분자이다.

<13> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 분리된 부착성 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기세포와 전기 방사 나노섬유 스캐폴드를 함유하는 조성물을 제공한다. 한 구체적인 태양에서는 이 나노섬유 스캐폴드가 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리락트산글리콜산(poly lactic glycolic acid(PLGA)), 제I형 콜라겐, 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE), 폴리(카프롤락톤), 폴리(L-락타이드-공중합-ε-카프롤락톤)[P(LLA-CL)](예를 들어 75:25) 및/또는 폴리(3-히드록시부티르산-공중합-3-히드록시발레르산)(poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)와 제I형 콜라겐의 공중합체로 된 섬유를 함유한다. 다른 어떠한 태양에서는 상기 나노섬유 스캐폴드가 평균 굵기가 약 250 나노미터 내지 약 10 μm인 섬유를 포함한다. 다른 어떠한 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포가 연골 발생 세포(chondrogenic cell)나 연골세포로 분화하는 조건 하에서 상기 조성물을 접촉한다. 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 조성물을 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 부착성 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기세포에 전기 방사 나노섬유 스캐폴드를 접촉시키는 단계를 포함하며, 이때 상기 나노섬유 스캐폴드는 PLLA 또는 PLGA를 약 20 kV에서 방사 바늘(needle)과 수집기 거리 약 30 cm로 유속 약 0.05 mL/분 내지 약 0.1 mL/분으로 전기방사하여 만드는데, 여기서 상기 PLLA나 PLGA는 대략 10% w/w 내지 약 20% w/w인 용액이다.

<14> 본 명세서의 다른 측면에서는 CD34⁺이고 CD45⁻인 분리된 태반 줄기세포를 제공한다. 어떤 실시 태양에서 상기 CD34⁺이고 CD45⁻인 줄기세포는 조혈 세포이다. 다른 어떠한 태양에서 상기 CD34⁺이고 CD45⁻인 줄기세포는 조직 배양 표면, 예를 들어 플라스틱 위에서 배양하였을 때 비부착성이다. 본 명세서의 한 특정 실시 태양에서는 CD34⁺이고 CD45⁻인 태반 줄기세포가 농축되어 있는 분리된 세포군을 제공한다. 특정한 실시 태양에서 상기 세포군 세포의 적어도 50%, 70%, 90% 또는 95%가 CD34⁺이고 CD45⁻인 태반 줄기세포이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 분리된 세포군은 태반 관류물(예를 들어 태반을 0.9% 식염수 750 mL로 관류한 관류물)에서보다 비례적으로 더 많이 CD34⁺과 CD45⁻ 태반 줄기세포를 함유한다. 다른 어떠한 태양에서는 이 분리된 세포군이 CD34⁺이고 CD45⁻이지 않은 줄기세포를 포함한다. 더 구체적인 태양에서는 CD34⁺이고 CD45⁻이지 않은 상기 줄기세포가 CD34⁻ 부착성 태반 줄기세포이다. 더 구체적인 태양에서 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD200⁺, CD105⁺, CD90⁺, CD10⁺, CD34⁻ 및/또는 CD45⁻이다. 다른 특정 태양에서 CD34⁺이고 CD45⁻이지 않은 상기 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포이다. 다른 특정한 실시 태양에서는 CD34⁺이고 CD45⁻이지 않은 상기 줄기세포가 CD34⁺, CD45⁺ 조혈 줄기세포이다. 다른 특정 실시 태양에서는 상기 CD34⁺이고 CD45⁻이지 않은 줄기세포를 제대혈이나 태반 혈액 속에 보관한다.

<15> 다른 특정한 실시 태양에서는 상기 분리된 세포군이 태반 관류물에서 얻은 복수의 총유핵 세포(total nucleated cell, TNC)이다. 어떠한 실시 태양에서는 태반 관류물에서 얻은 상기 총유핵 세포가 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 또는 500 mL의 태반 관류물에서 얻은 태반 세포를 포함한다. 다른 특정 태양에서는 이 태반 관류물 유래 총유핵 세포는 적어도 한 종류의 비적혈구 세포를 처리하여 제거한 것이다.

<16> 다른 실시 태양에서, 상기 CD34⁺, CD45⁻ 조혈 태반 줄기세포는 태아(비모체) 유래이다. 다른 태양에서는 상기 CD34⁺, CD45⁻ 조혈 태반 줄기세포가 모체 유래이다. 다른 태양에서는 간 형성성인, 분리된 조혈 태반 세포군이 태아(비모체) 유래의 CD34⁺, CD45⁻ 조혈 태반 줄기세포를 더 포함한다. 다른 태양에서 상기 분리된 조혈 태반

줄기세포군은 모체 유래인 CD34⁺, CD45⁻ 조혈 줄기 태반 줄기세포를 함유한다.

- <17> 본 명세서의 다른 측면에서는 상기 CD34⁺, CD45⁻ 조혈 태반 줄기세포를 분리하는 방법을 제공한다. 한 실시 태양에서 본 발명은 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포군을 분리하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 줄기세포군에서 CD34⁺ 세포를 선별하여 분리된 CD34⁺ 태반 세포군을 형성하는 단계와 상기 CD34⁺ 태반 세포군으로부터 CD45⁺ 세포를 제거하는 단계를 포함하며, CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포군을 생산한다. 한 특정 태양에서는 상기 CD34⁺ 세포 선별을 면역 분리법으로 수행한다. 다른 특정 태양에서는 상기 CD45⁻ 세포 제거가 면역 분리법으로 이루어진다. 다른 특정 실시 태양에서는 상기 선별이나 제거가 흐름 세포 측정법으로 이루어진다.
- <18> 본 명세서의 다른 측면에서는 세포군의 보강 방법을 제공하는데, 이 방법은 복수의 CD34⁺, CD45⁻ 조혈 태반 줄기세포를 부가하여 보강된 세포군을 만들되, 이 보강된 세포군은 보강 전보다 CD34⁺, CD45⁻ 세포를 상당히 더 많이 포함하는 것이다. 이러한 맥락에 따른 여러 가지 특정 실시 태양에서 "상당히 더 많이"란 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 적어도 10% 더 많은 것을 의미한다. 다른 구체적인 태양에서는 상기 보강할 세포군이 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액 또는 이들의 조합을 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 보강할 세포군은 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액 또는 이들의 조합이다. 다른 더 구체적인 태양에서 이 보강할 세포군은 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액 또는 이들의 조합에서 분리한 유헤 세포를 함유한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 이 보강할 줄기세포군이 조혈 줄기세포군, 성체 줄기세포군 또는 배아 줄기세포군을 포함한다.
- <19> 본 명세서에서 "SH2"라는 용어는 CD105 표지 분자 표면의 항원 결정기에 결합하는 항체를 일컫는다. 따라서 SH2⁺로 나타내는 세포는 CD105⁺이다.
- <20> 본 명세서에서 "SH3"과 "SH4"라는 용어는 CD73 표지 분자 표면의 항원 결정기에 결합하는 항체들을 일컫는다. 즉 SH3⁺ 및/또는 SH4⁺라고 나타낸 세포는 CD73⁺이다.
- <21> 본 명세서에서 "분리된 줄기세포"라는 용어는 상기 줄기세포가 유래한 조직, 예를 들어 태반의 다른 비줄기세포로부터 실질적으로 분리된 줄기세포를 말한다. 줄기세포는 자신과 자연 상태에서 결부된 비줄기세포 또는 다른 표지 상(marker profile)을 나타내는 줄기세포 중 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 적어도 99%를 예를 들어 상기 줄기세포의 수집 및/또는 세포 배양 과정에서 제거하였을 때 "분리된" 줄기세포가 된다.
- <22> 본 명세서에서 "분리된 세포군(isolated population of cells)"이라는 용어는 상기 세포군이 유래한 조직, 예를 들어 태반의 다른 세포들로부터 실질적으로 분리된 세포군을 말한다. 줄기세포는 상기 세포군이 자연 상태에서 결부된 세포 또는 상기 세포군이 유래한 세포, 즉 다른 표지상(marker profile)을 나타내는 줄기세포들 중 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 적어도 99%가 상기 줄기세포군의 수집 및/또는 세포 배양 과정에서 제거되었을 때 "분리된" 세포군이다.
- <23> 본 명세서에서, "태반 줄기세포"라는 용어는 형상, 세포 표면 표지 또는 1차 배양 후 계대 수에 무관하게 포유류 태반에서 유래한 줄기세포 또는 전구세포, 예를 들어 중복성 세포(multipotent cell)이다. 그러나 본 명세서에서 "태반 줄기세포"라는 용어는 영양막 세포(trophoblast), 세포 영양막 세포(cytotrophoblast), 배아 생식 세포 또는 배아 줄기세포를 가리키는 것은 아니다. 세포는 줄기세포의 특징 중 적어도 하나, 예를 들어, 표지 또는 유전자 발현 상(profile)이 하나 이상 유형의 줄기세포와 관련되거나, 배양시 적어도 10~40회 복제할 수 있으며, 중복성(multipotency), 예를 들어, 시험관내 또는 생체내 혹은 양쪽 모두에서 3대 배엽층 중 하나 이상의 모든 세포로 분화할 수 있는 능력, 성체(즉 분화한) 세포 특성의 결여 등을 갖추고 있으면 "줄기세포"라고 간주한다. "태반 줄기세포"와 "태반 유래 줄기세포"라는 용어는 서로 교환하여 쓰일 수 있다. 본 명세서에서 달리 언급이 없는 한 "태반"이라는 용어는 탯줄을 망라한다. 본 명세서에서 개시하는 부착성 태반 줄기세포는 몇몇 실시 태양에서는 시험관 내에서 중복성(즉 시험관 내의 분화 조건하에서 이들 세포가 분화)이거나, 생체 내에서 중복성(즉 이들 세포는 생체 내에서 분화)이거나 양쪽 모두이다.
- <24> 본 명세서에서 줄기세포는 어느 표지를 배경값(background)을 넘어 검출할 수 있으면 그 표지에 대하여 "양성"이다. 이를 테면 태반 줄기세포는 예를 들어 CD73에 대하여 양성(즉 CD73⁺)인데, 이는 태반 줄기세포에서 CD73 신호가 배경값 신호보다 예를 들어 흐름 세포 측정법상으로 측정 가능하게 더 큰 신호를 나타내기 때문(이를 테면 동중 세포 유형 대조군에 견주어)이다. 세포는 또한 어느 표지를 이용하여 그 세포를 적어도 하나의 다른

세포 유형과 구별할 수 있을 때 또는 그 표지가 세포 표면에 나타나거나, 발현될 때 그 표지를 이용하여 그 세포를 선별 또는 분리할 수 있으면 그 표지에 대하여 양성이다. 예를 들어 항체 매개 검출의 맥락에서는 어느 특정 세포 표면 표지가 존재하는지의 척도로서 "양성"이란 그 표지를 항체, 예를 들어 그 표지에 대하여 특이적인 형광 표지 항체로 검출할 수 있다는 것을 의미한다. "양성"이란 또한 세포가 배경값보다 더 큰 값으로 신호, 예를 들어 세포 측정 장치의 신호를 낼 수 있는 만큼의 양으로 그 표지를 가지고 있다는 것을 뜻한다. 예를 들어 세포를 CD200에 특이적인 항체로 검출 가능하게 표지할 수 있고, 이 항체로부터의 신호가 대조군(예를 들어 배경값)보다 검출 가능하게 더 크면 그 세포는 "CD200⁺"이다. 역으로 같은 맥락에서 "음성"이란 그 세포 표면 표지에 특이적인 항체를 사용하여도 배경값에 비교하여 그 표지를 검출할 수 없음을 뜻한다. 예를 들어 CD34에 특이적인 항체로 세포를 검출 가능하게 표지할 수 없으면 그 세포는 "CD34⁻"이다. 본 명세서에서 달리 언급이 없는 경우 분화 집단(cluster of differentiation) 표지는 항체를 써서 검출한다. OCT-4의 존재를 측정하여 결정할 수 있으며, OCT-4를 RT-PCR로 검출 가능하면 그 세포는 "OCT-4⁺"이다.

<25> 본 명세서에서 태반 줄기세포, 예를 들어 부착성 태반 줄기세포 또는 CD34⁺, CD45⁻ 줄기세포 "분리"하는 것은 처리하지 않은 포유류 태반 속에서 이 줄기세포와 정상적으로 결부되어 있는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%를 제거한 것을 의미한다. 어느 장기에서 유래한 줄기세포는 처리하지 않은 그 장기 속에서 그 줄기세포와 정상적으로 결부되어 있는 세포를 50% 미만으로 함유하는 세포군 속에 있을 때 "분리"된 것이다. 어느 세포 표지가 "어둡다(dim)"는 것은 그 표지를 배경으로부터 검출 가능하지만, 그 신호가 배경값보다 약 5% 내지 약 10% 클 뿐이라는 것을 뜻한다.

<26> 본 명세서에서 "간세포(hepatocyte)"란 시각적으로, 생화학적으로 및/또는 유전자 발현 양태에 의하여 일반적으로 이 분야에서 이해하고 있는 의미의 간세포로 보이는 세포를 말한다. 본 명세서에서 "간형성성(hepatogenic) 세포"란 태반 줄기세포 또는 제대혈 줄기세포에서 분화된 세포를 가리키는 것으로서, 분화 완료한(terminally differentiated) 간세포의 특성을 한 가지 이상으로 나타내는 세포를 의미하는데, 이 특성은 태반 줄기세포 또는 제대혈 줄기세포가 간세포 또는 간 형성성 세포(예를 들어 증폭성 배양물(expansion culture) 속의 태반 줄기세포나 제대혈 줄기세포)로 분화하기 전에는 찾을 수 없거나, 분화하기 전의 태반 줄기세포나 제대혈 줄기세포에서는 같은 수준으로 나타나지 않는(예를 들어 같은 조건으로 그 특성을 분석하였을 때 태반 줄기세포나 제대혈 줄기세포와 비교하여 간 형성성 세포에서는 검출 가능하게 높거나 낮은) 것이다. 따라서 본 출원의 다양한 조성물, 방법과 기타 실시 태양은 또한 간세포로 완전히 또는 부분적으로 분화된 태반 줄기세포에서 유래한 세포도 망라하고 있다.

<27> **1. 간세포의 생산**

<28> 이하의 명세서 장들과 그 안에 논의하는 내용에 관하여, 이 분야의 당업자라면 그 다양한 조성물과 방법 중 수많은 것을 간세포 계통으로 분화하였거나 분화시킨 태반 줄기세포를 대상으로, 또는 이들에 대하여 적용할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

<29> 본 명세서의 한 측면에서는 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 태반 유래 세포, 특히 태반 줄기세포 또는 제대혈 줄기세포로부터 생산하기 위한 방법과 조성물을 제공한다. 본 명세서에서 "태반 줄기세포" 또는 "제대혈 줄기세포"는 달리 특정하지 않는 한 부착성 줄기세포를 뜻한다. 줄기세포는 포유동물 태반이나 제대혈로부터 관류(예를 들어 Hariri의 미국 특허 제7,045,148호와 7,255,879호를 보라. 이들은 인용에 의하여 그 내용 전부가 본 명세서에 포함된다.)를 통하여 얻을 수 있다. 줄기세포를 또한 태반이나 그 일부분을 파괴(예를 들어 습식 분쇄(maceration))함으로써 태반이나 탯줄로부터 얻을 수 있다(아래 실시예 2절을 보라). 간세포의 특성을 나타내는 세포, 예를 들어 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 태반 줄기세포로부터 얻을 수도 있다. 이 세포는 예를 들어 알코올 섭취에 의한 간 경화, *Amanita* 속 버섯 등에서 찾을 수 있는 간 독소의 섭취에 의한 간 경화 또는 바이러스 감염, 예를 들어 A, B, C, D 또는 E형 간염 감염에 의한 간 경화를 포함하지만 이에 한정되지는 않는 간 경화에 관련된 질병, 장애나 상태를 치료하는데 유용하다.

<30> 한 실시 태양에서는 줄기세포 등의 분화할 수 있는 세포를 다음과 같이 하여 태반이나 탯줄로부터 얻을 수 있다. 단핵세포(mononuclear cell, MNC)의 초대 배양물을 태반, 예를 들어 사람 태반 관류물로부터, 또는 물리 및/또는 효소적 방법으로 파괴한 태반 조직으로부터 분리한다. 태반은 만기 분만 후에 기증자에게 충분한 설명에 이은 동의를 받아서 입수한다. 간략하게, 관류를 위해서는 제대 혈관에 삽관을 하고 이를 유속 조절 회로에 연결한 다음 태반을 예를 들어, 분당 약 1 mL(실온, 24시간까지)로 고농도 포도당, 1% 헤파린과 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM, Gibco/BRL사)로 관류한다. 태반 관류물(750 mL)를 이

어서 모으고, 원심분리한 다음, 그 세포 펠렛은 1% 송아지 태아 혈청(FBS) 함유 PBS에 현탁하고, 이를 LYMPHOPREP(상표 Gibco/BRL사)을 이용한 분별 농도구배 밀도 원심분리로 분리한다. 부착성 태반 줄기세포를 포함하는 단핵 세포를 함유하는 백혈구 연층(buffy coat) 을 회수한 다음, DMEM/10% FBS 속에 현탁하고 피브로넥틴 피복 Falcon 튜브(Sigma사) 위에 도포한 다음 5% 가슴 CO₂ 하에서 37°C로 배양한다. 24시간 배양 후 비부착성 세포를 떼기하고, 부착성 세포를 새 배양 배지 속에서 유지하고 증폭한다. 개별 세포 콜로니는 10~18일 사이에 생기며 태반 줄기세포주로 증폭한다.

<31> 사람 부착성 태반 줄기세포는 배양할 때 섬유모세포 유사 형태를 띠며 HLA 클래스 I에 대하여 양성이다. FACS 분석을 하였을 때 이 세포들은 CD34 또는 CD45 조혈 표지를 나타내지 않는다. 그러나 이 세포들은 중복성(multipotential) 세포 표지인 CD10(CALLA), CD29(β_1 인테그린), CD54(ICAM-1), CD90(Thy-1)과 SH2(CD105), SH3(CD73) 및 CD200을 발현한다. 표준적인 성장 조건에서 태반 줄기세포의 배증 시간은 약 18 내지 36 시간이며, 이 세포들은 이러한 표현형을 시험관내에서 40 차례를 넘는 배증 동안 유지한다. 사람 부착성 태반 줄기세포는 사람 배아 줄기세포나 배아 생식세포와 구별할 수 있는데, 사람 배아 줄기세포나 생식 세포는 태반이 아닌, 포배나 태아 생식기 내부의 세포 덩어리로부터만 얻을 수 있다는 점에서 그러하다. 사람 부착성 태반 줄기세포는 또한 중간엽 줄기세포, 예를 들어 골수, 제대혈 또는 말초 혈액이나 골수 유래 줄기세포로부터 구별할 수 있는데, 태반 줄기세포는 배양시 배아 유사체(embryoid-like body)를 형성하지만 중간엽 줄기세포나 골수 유래 줄기세포는 형성하지 않으며, 태반 줄기세포는 중간엽 줄기세포에 비추어 독특한 유전자 발현 양상을 보인다는 점에서 그러하다. 2006년 12월 28일 출원한 미국 특허 출원 제11/648,813호를 보라. 이 출원의 내용 전부는 인용에 의하여 본 명세서에 포함된다.

<32> 태반 줄기세포를 부티르산나트륨을 함유하는 배양 배지 속에서 배양하거나 적절한 마이크로캡슐용 고분자, 예를 들어 알긴산-폴리-L-리신으로 세포를 캡슐화함으로써 간세포로 분화시킬 수 있다. 간세포는 전술한 방식으로 태반 유래 줄기세포에서 생산할 수 있으며, 후술하는 바와 같이 유지하거나 증폭할 수 있다. 간세포의 분화는 후술하는 바와 같이 흐름 세포 측정법을 이용하여 어떠한 유전자의 발현이나 효소 활성을 관찰하여 평가할 수 있다.

<33> **2. 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군**

<34> 한 측면에서 본 명세서에서 제공하는 방법은 부착성 태반 줄기세포를 이용하는데, 부착성 태반 줄기세포란 태반의 일부, 예를 들어 양막, 융모막, 양막/융모막 판, 탯줄 등으로부터 얻을 수 있는 줄기세포로서 (1) 조직 배양 기질에 부착하고, (2) 적절한 분화 조건 하에서 하나 이상의 비태반 세포 유형 및/또는 조직 특이적 세포 특성을 가지는 세포로 분화하는 능력을 갖추고 있는 것이다. 태반 줄기세포는 태반 혈액 또는 제대혈 등의 혈액이나 골수에서 유래하지 않으며 유래할 수도 없다.

<35> 태반 줄기세포는 태아 또는 모체에서 유래한 것(즉 태아 아니면 모체의 유전형질을 띠 수 있음)이다. 태반 줄기세포군 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 상기 태반 줄기세포를 함유하는 세포군은 아래에 기술하는 형태학적 표지와 배양 특성에 따라 동정되고 선택될 수 있다.

<36> **2.1 물리적 및 형태학적 특성**

<37> 본 발명에서 사용되는 태반 줄기세포는 1차 배양되거나 세포 배양되었을 때 조직 배양 기질, 예를 들어 조직 배양 용기의 표면(조직 배양용 플라스틱 등)에 부착한다. 배양 중, 예를 들어 조직 배양 표면 위의 태반 줄기세포는 일반적으로 섬유모세포 형상이며 별 모양이고 세포체의 중심에서 세포질 돌기가 몇 군데 불거져 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.

<38> **2.2 세포 표면, 분자 표지와 유전적 표지**

<39> 본 발명의 방법과 조성물에 유용한 부착성 태반 줄기세포와 부착성 태반 줄기세포군은 상기 줄기세포 또는 이 줄기세포를 함유하는 세포군의 동정 및/또는 분리에 쓰일 수 있는 표지를 여러 개 발현한다. 본 발명의 태반 줄기세포와 줄기세포군(즉 둘 이상의 태반 줄기세포)은 태반으로부터 직접 얻거나 태반의 어느 일부분(예를 들어 양막, 융모막, 태반의 태반엽, 탯줄 등)에서 얻은 줄기세포와 줄기세포 함유 세포군을 포함한다. 태반 줄기

세포군은 또한 배양 중인 태반 줄기세포와 백과 같은 용기 안에 든 세포의 군(즉 둘 이상의 태반 줄기세포)을 포함한다. 태반 줄기세포는 하지만 영양막 세포가 아니다.

<40> 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포는 시험관내에서 세 배엽층을 대표할 수 있는 세포, 예를 들어 지방 세포 유사 세포, 연골세포 유사 세포, 간세포, 신경원성(neurogenic) 세포, 심장 세포 등의 세포로 분화할 수 있다는 점에서 중복성(multipotent)이다. 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포는 그러나 중복성이기 위하여 또는 유용하기 위하여 생체내에서 분화할 필요는 없다. "태반 줄기세포"라는 용어는 따라서 본 명세서에서 기술하는, 시험관내에서 분화하지만 생체내에서는 그러하지 않는 세포, 생체내에서 분화하지만 시험관내에서는 않는 세포, 또는 양쪽에서 분화하는 세포를 망라하고 있다. 본 명세서의 한 실시 태양에서 제공하는 태반 줄기세포는 시험관내에서 세 배엽층 중 하나 이상을 대표할 수 있는 세포로 분화할 수 있지만 생체내, 예를 들어 NOD-SCID 마우스 속에서는 분화하지 못한다.

<41> 부착성(조혈성이 아닌) 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)을 발현하지만 일반적으로 HLA-DR을 발현하지는 않는다. 어떠한 실시 태양에서는 부착성 태반 줄기세포가 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺이다. 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. 이러한 태반 줄기세포와 그러한 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 간세포, 간 형성성 세포, 간세포군, 간 형성성 세포군과 이들의 조합으로 분화할 수 있다.

<42> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD200⁺, HLA-G⁺인 분리된 태반 줄기세포를 사용한다. 어떠한 실시 태양에서는 이 줄기세포가 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 줄기세포는 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<43> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD200⁺, HLA-G⁺인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 사용한다. 여러 실시 태양에서 상기 세포군 속의 상기 태반 줄기세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 상기 CD200⁺, HLA-G⁺인 줄기세포이다. 상기 분리된 세포군의 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포가 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 태양에서 상기 분리된 세포군은 배아 유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아 유사체를 형성한다. 다른 태양에서 상기 세포군은 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<44> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD73⁺, CD105⁺와 CD200⁺인 분리된 태반 줄기세포를 사용한다. 상기 세포군의 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 또한 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻이고 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<45> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 사용한다. 여러 실시 태양에서 상기 세포군 속의 상기 태반 줄기세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적

어도 95%가 상기 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺인 줄기세포이다. 상기 분리된 세포군의 특정 실시 태양에서는 이 줄기 세포가 HLA-G⁺이다. 한 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 한 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻이고 HLA-G⁺이다. 다른 태양에서 상기 세포군은 배아 유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아 유사체를 형성한다. 다른 태양에서 상기 세포군은 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<46> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD200⁺이고 OCT-4⁺인 분리된 태반 줄기세포를 사용한다. 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 또한 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 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 줄기세포는 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<47> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD200⁺이고 OCT-4⁺인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 사용한다. 여러 실시 태양에서 상기 세포군 속의 상기 태반 줄기세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 상기 CD200⁺이고 OCT-4⁺인 줄기세포이다. 한 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포가 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포가 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺이다. 다른 특정 태양에서 상기 세포군은 배아 유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아 유사체를 형성한다. 다른 특정 태양에서 상기 세포군은 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<48> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 분리된 태반 줄기세포군을 사용한다. 상기 복수의 세포의 특정한 실시 태양에서는 이 줄기세포가 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 OCT-4⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD200⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺이고 CD200⁺이다. 다른 특정 태양에서 상기 줄기세포는 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<49> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 사용한다. 여러 실시 태양에서 상기 세포군 속의 상기 태반 줄기세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 상기 CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 줄기세포이다. 전술한 복수 세포의 한 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포가 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 태양에서는 이 줄기세포가 OCT-4⁺이다. 다른 특정 태양에서는 이 줄기세포가 CD200⁺이다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺이고 CD200⁺이다. 다른 특정 태양에서 상기 세포군은 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<50> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 또한 CD73⁺, CD105⁺ 줄기세포인 복수의 태반 줄기세

포를 함유하는 분리된 세포군을 이용하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건에서 하나 이상의 배아유사체를 형성한다. 여러 실시 태양에서 상기 세포군 속의 상기 태반 줄기세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 상기 CD73⁺, CD105⁺인 줄기세포이다. 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. 다른 특정 태양에서 상기 세포군은 증폭된 것인데, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 적어도 다섯 차례, 적어도 10 차례, 적어도 15 차례 또는 적어도 20 차례 계대된 것이다.

<51> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 OCT-4⁺ 줄기세포인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성한다. 다양한 실시 태양에서 상기 세포군 속 상기 태반 줄기세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%는 상기 OCT-4⁺ 줄기세포이다. 상기 세포군의 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 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 또는 적어도 스무 차례 계대(passage)된 것이다.

<52> 한 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻이고 CD133⁻인 분리된 태반 줄기세포 혹은 이러한 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 사용한다.

<53> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺인 분리된 태반 줄기세포를 이용한다. 나아가 본 명세서에서는 세포, 예를 들어, 태반 줄기세포의 분리된 군을 제공하는데, 여기서는 그 태반 줄기세포의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺이다. 상기 실시 태양들 중 특정한 태양에서는 이 줄기세포가 또한 CD90⁺이고 CD45⁻이다. 한 특정 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군이 그와 같은 특성을 나타내지 않는 태반 줄기세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정한 태양에서는 이 분리한 태반 줄기세포가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 태양에서는 상기 분리된 태반 줄기세포군의 상기 세포의 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 모체 유래하지 않는다.

<54> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻이고 CD34⁻인 분리된 태반 줄기세포를 이용한다. 나아가 본 명세서에서는 태반 줄기세포의 분리된 군을 제공하는데, 여기서는 그 태반 줄기세포의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻이고 CD34⁻이다. 한 특정 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 태반 줄기세포군이 그와 같은 특성을 나타내지 않는 태반 줄기세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정한 태양에서는 이 분리한 태반 줄기세포가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 태양에서는 상기 분리된 태반 줄기세포군의 상기 세포의 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 모체 유래하지 않는다. 다른 태양에서는 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻이고 CD34⁻인 상기 태반 줄기세포가 태반 관류물에서 분리한 줄기세포이다. 다른 태양에서는 상기 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻이고 CD34⁻인 태반 줄기세포가 태반 조직을 물리 및/또는 효소적으로 파괴하여 분리한 줄기세포이다.

<55> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻이고 CD133⁻인

분리된 태반 줄기세포를 이용한다. 나아가 본 명세서에서는 태반 줄기세포의 분리된 군을 제공하는데, 여기서는 그 태반 줄기세포의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻이고 CD133⁻이다. 한 특정 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정한 태양에서는 이 분리한 태반 줄기세포가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 태양에서는 상기 분리된 태반 줄기세포군의 상기 세포의 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군이 그와 같은 특성을 나타내지 않는 태반 줄기세포로부터 분리해 낸 것이다. 본 명세서의 다른 태양에서는 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻이고 CD133⁻인 태반 줄기세포를 태반 관류물로부터 분리하는 단계를 포함하는 상기 태반 줄기세포의 획득 방법을 제공한다. 다른 태양에서는 상기 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻이고 CD34⁻인 태반 줄기세포가 태반 조직을 물리 및/또는 효소적으로 파괴하여 분리한 줄기세포이다.

<56> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻이고 CD117⁻인 분리된 태반 줄기세포를 이용한다. 나아가 본 명세서에서는 태반 줄기세포의 분리된 군을 제공하는데, 여기서는 그 태반 줄기세포의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻이고 CD117⁻이다. 한 특정 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정한 태양에서는 이 분리한 태반 줄기세포가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 태양에서는 상기 분리된 태반 줄기세포군의 상기 세포의 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군이 그와 같은 특성을 나타내지 않는 태반 줄기세포로부터 분리해 낸 것이다. 본 명세서의 다른 태양에서는 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻이고 CD117⁻인 태반 줄기세포를 태반 관류물로부터 분리하는 단계를 포함하는 상기 태반 줄기세포의 획득 방법을 제공한다. 다른 태양에서는 상기 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻이고 CD34⁻인 태반 줄기세포가 태반 조직을 물리 및/또는 효소적으로 파괴하여 분리한 줄기세포이다.

<57> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고 CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대하여 양성 및/또는 CD117에 대하여 음성인 분리된 태반 줄기세포를 이용한다. 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 방법과 조성물에 쓰이는 분리된 태반 줄기세포군은 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이며, 상기 세포군 속 줄기세포의 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 대하여 양성 및/또는 CD117에 대하여 음성이다. 한 특정 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포로부터 분리해 낸 것이다. 다른 특정한 태양에서는 이 분리한 태반 줄기세포가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 태양에서는 상기 분리된 태반 줄기세포군의 상기 세포의 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포 또는 태반 줄기세포군이 그와 같은 특성을 나타내지 않는 태반 줄기세포로부터 분리해 낸 것이다. 본 명세서의 다른 태양에서는 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고 CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대하여 양성 및/또는 CD117에 대하여 음성인 태반 줄기세포를 태반 관류물로부터 분리하는 단계를 포함하는 상기 태반 줄기세포의 획득 방법을 제공한다.

<58> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 항체 결합으로 판정하여 CD200⁺이고 CD10⁺이면서 항체 결합과 RT-PCR로 판정하여 CD117⁻인 태반 줄기세포나 그러한 세포의 세포군 또는 그러한 분리된 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 이용한다. 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법은 CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁺, HLA 클래스 I⁻이고 β-2-마이크로글로불린⁻인 태반 줄기세포를 이용한다. 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 적어도 하나의 표지가 중간엽 줄기세포(예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포)보다 적어도 2배 더 높이 발현되는 태반 줄기세포를 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 분리된 태반 줄기세포가 모체 유래하지 않는다. 다른 특정 태양에서는 상기 Q분리된 태반 줄기세포군 속 상기 세포의 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%가 모체에서 유래하지 않는다.

<59> 다른 실시 태양에서 본 명세서에서 제공하는 방법과 조성물에서 쓰이는 태반 줄기세포는 사이토케라틴

(cytokeratin) 18에 대하여 양성이다. 본 명세서의 다른 태양에서는 전체의 적어도 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 사이토케라틴 18에 대하여 양성인 태반 줄기세포 또는 이들로부터 분화된 세포들의 세포군 제공한다. 본 명세서의 다른 태양에서는 태반 줄기세포 또는 그로부터 분화된 세포의 적어도 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 사이토케라틴 18에 대하여 양성인 태반 줄기세포 또는 이들로부터 분화된 세포들을 함유하는 세포군을 제공한다. 본 발명의 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포, 태반 줄기세포군 또는 이들로부터 분화된 세포의 분리 방법을 제공하는데, 이 방법은 사이토케라틴 18⁺인 태반 줄기세포 또는 사이토케라틴 18⁺인 태반 줄기세포들을 선별하는 단계와 상기 줄기세포 또는 줄기세포들을 여타 태반 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다.

<60> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 방법과 조성물은 분리된 태반 줄기세포군을 사용하는데, 이 태반 줄기세포 중 복수는 알데히드 탈수소효소(ALDH)에 대하여 양성이며, 양성 여부는 알데히드 탈수소효소 활성 분석에 따른다. 이러한 분석법은 종래 기술(예를 들어 Bostian과 Betts의 *Biochem. J.*, 173, 787, (1978)을 보라)로 잘 알려져 있다. 특정 태양에서, 상기 ALDH 분석법은 ALDEFLUOR(등록상표, 미국 오레곤 주 Ashland의 Aldagen Inc.사)를 알데히드 탈수소효소 활성의 지표로 사용한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 복수의 줄기세포는 상기 세포군에서 세포의 약 3%에서 약 25% 사이이다. 다른 실시 태양에서는 본 명세서에서 제공하는 방법과 조성물이 태반 줄기세포군을 사용하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포 중 복수는 알데히드 탈수소효소에 대하여 양성이며, 이는 알데히드 탈수소효소 활성의 지표로 ALDEFLUOR(등록상표)를 사용하는 활성 분석법으로 평가한다. 한 특정 태양에서 상기 복수의 줄기세포는 상기 세포군에서 세포의 약 3%에서 약 25% 사이이다. 다른 태양에서 상기 태반 줄기세포 또는 제대 줄기세포의 세포군은 같은 세포 수의, 같은 조건에서 배양한 골수 유래 중간엽 줄기세포보다 적어도 세 배 또는 적어도 다섯 배 더 높은 ALDH 활성을 보인다.

<61> 전술한 태반 줄기세포의 한 구체적 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 IL-6, IL-8과 단핵구 세포 유인 화학물질(chemoattractant) 단백질(MCP-1)을 구성적으로(constitutively) 분비한다.

<62> 각각의 상기 언급한 태반 줄기세포 또는 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, 35, 40 또는 그 이상 계대되고 배양된 태반 줄기세포 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

<63> 전술한 복수의 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, 혹은 이 정도 수 이하의 줄기세포를 함유한다.

<64> **2.3 태반 줄기세포군의 선별과 제조**

<65> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 복수의 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⁺, HLA-G⁺ 태반 줄기세포인 태반 세포군을 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 이 태반 줄기세포를 간세포 및/또는 간 형성성 세포로 분화할 수 있다. 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 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺이고 CD105⁺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.

<66> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 복수의 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 줄기세포인 복수의 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 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 태반 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.

<67> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 복수의 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 줄기세포인 복수의 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 CD73⁺, CD105⁺이기도 한 태반 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 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<68> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 복수의 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 줄기세포인 복수의 태반 세포를 선별하는 단계를 포함한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 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 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺이고 CD200⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<69> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 복수의 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 줄기세포인 복수의 태반 세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 태반 세포는 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 배아유사체를 형성한다. 한 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 OCT-4⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

<70> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 분리된 태반 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⁺ 줄기세포인 복수의 태반 세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 태반 세포는 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 배아유사체를 형성한다. 한 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD73⁺이고 CD105⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 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.

<71> 본 명세서에서는 또한 복수의 태반 줄기 세포 또는 줄기세포군을 제조하는 방법을 제공하는데, 이러한 세포는 본 명세서에서 제공하는 방법과 조성물에 쓰일 수 있다. 예를 들어 본 명세서에서는 세포군을 제조하는 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. 본 명세서의 한 특정 실시

태양에서는 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나, CD73, CD105와 CD200을 발현하거나, CD200과 OCT-4를 발현하거나 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 혹은 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나, OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다.

<72> 본 명세서의 더 구체적인 실시 태양에서는 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 HLA-G를 발현하는 태반 줄기세포를 선별하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함한다. 본 명세서의 다른 구체적 실시 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 본 명세서의 다른 특정 실시 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 OCT-4를 발현하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 본 명세서의 다른 특정 실시 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73과 CD105를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하는 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 발현하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 본 명세서에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다.

<73> **2.4 세포 배양하의 성장**

<74> 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포의 성장은, 모든 포유류 세포와 마찬가지로 세포 성장용으로 선택한 특정 배지에 부분적으로 달려있다. 최적 조건 하에서 태반 줄기세포는 3~5일 만에 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.

<75> 본 명세서에서 제공하는 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 아주 초기의 줄기세포와 연관된 표지, 예를 들어 OCT-4, Nanog, SSEA3와 SSEA4를 발현한다. 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 구애받지 않는 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.

<76> **2.5 세포 분화**

<77> 본 명세서에서 제공하는 방법에 유용한 태반 줄기세포는 서로 다른 수임(committed) 세포 계통으로 분화할 수 있다. 예를 들어 이 태반 줄기세포는 간세포 계통의 세포로 분화할 수 있다. 이러한 세포 분화는 예를 들어 세포 분화 분야에서 알려진 모든 방법, 예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포를 유사한 세포 계통으로 분화하는 방법을 써서 이를 수 있다. 2006년 12월 28일 제출된 미국 특허 출원 제11/648,813호를 보라. 이 명세서는 인용에 의하여 상기 인용 문헌의 내용 전부를 포함하고 있다.

<78> 분화할 태반 줄기세포는 고분자 담체, 예를 들어 알긴산(alginate) 속에 담겨 있을 수 있다. 본 명세서의 한 실시 태양에서는 복수의 세포가 알긴산 속에 캡슐화된(encapsulated) 조성물을 제공한다. 이 세포들은 간세포나 간 형성성 세포로 태반 줄기세포가 분화하도록 하는 조건에 노출되지 않은 태반 줄기세포일 수 있다. 이 세포는 또한 간세포이거나 간 형성성 세포일 수 있다. 이 세포는 또한 이들의 모든 조합일 수 있다. 상기 고분

자, 예를 들어 알긴산 속에 담긴 간 형성성 세포 및/또는 간세포는 태반 줄기세포에서 분화된 세포들이다. 한 실시 태양에서는 이 세포가 태반 줄기세포에서는 발현하지 않거나 검출 가능하게 다른 수준으로 발현하는 간세포의 표지를 적어도 하나 발현한다. 바람직하게는 이 고분자, 예를 들어 알긴산은 비드 형태로서 복수의 태반 줄기세포, 간 형성성 세포, 간세포 또는 이들의 조합을 캡슐화한다. 이 비드의 크기는 변할 수 있다. 예를 들어 이 비드의 크기는 약(예를 들어 $\pm 10\%$) 100 μm 내지 약 1000 μm 사이일 수 있다. 어떠한 한 태양에서는 이 비드의 크기가 약 200 μm 내지 약 800 μm 이다. 다른 어떠한 태양에서는 이 비드의 평균 크기가 약 500 μm 이다.

<79> **3. $\text{CD34}^+ \text{CD45}^-$ 태반 줄기세포와 이를 함유하는 세포군**

<80> 본 명세서의 다른 측면에서는 분리된 조혈성 CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포 및/또는 CD34^+ , CD45^{dim} 태반 줄기세포와 CD34^+ , CD45^{dim} 태반 줄기세포가 농축된 분리된 세포군을 제공한다. 본 명세서에서 " CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포"란 적어도 한 유형의 성숙한 혈액 세포 또는 성숙한 혈액 세포의 전구체로 분화할 수 있으면서 태반 혈액이나 제대혈에서 얻지 않고 태반에서 얻은 세포를 가리키며, 몇몇 실시 태양에서는 $\text{CD34}^+ \text{CD45}^{\text{dim}}$ 태반 줄기세포를 포함하기도 한다. 이 CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포는 CD34 표지에 대하여 검출 가능하게, 예를 들어 CD34 에 대한 표지 항체로 검출 가능하게 양성이며, CD45 에 대하여 음성이거나 어둡다(dim), 즉 예를 들어 CD45 에 대한 형광 표지 항체로 배경값보다 더 큰 밝기로 표지되지 않는다. CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포와 CD34^+ , CD45^{dim} 태반 줄기세포는 비부착성인 것이 전형적인데, 즉 이들은 조직 배양 표면에 부착하지 않는다.

<81> 한편 본 명세서에서는 CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포 및/또는 CD34^+ , CD45^{dim} 태반 줄기세포가 농축되어 있는 태반 세포군도 제공한다. 본 명세서에서 "농축"되었다는 것은 그 태반 줄기세포군이 태반 관류물에서 볼 수 있는 것보다 CD34^+ , CD45^- 세포를 더 많이 또는 더 높은 백분율로 함유한다는 것을 가리키는데, 이 때 이 태반 관류물은 사람 태반에서 제대혈과 태반 혈액을 방혈하고 그 태반을 관류액 약 100 mL로 사전 관류하고 나서, 분당 약 50 mL의 비율로 관통시킨 관류액(예를 들어 0.9% NaCl) 약 750 mL를 포함한다. 한 구체적인 실시 태양에서, CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포는 태반 관류물에서 볼 수 있는 것보다 세포군 속에 더 높은 백분율로 함유되는데, 예를 들어 이 태반 줄기세포는 전체 세포군 속 세포의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%를 차지한다. 다른 특정 태양에서는 이 줄기세포군이 CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포를 약 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 또는 1×10^7 개 또는 적어도 그만큼 함유한다.

<82> 약 1억개의 총유핵 세포로 된 태반 관류액 유래 세포군에서 CD34^+ 세포는 약 5%이며, 생존율을 고려한 태반으로부터의 최종 수득물은 CD34^+ 줄기세포 약 1백만개이다. 수집한 CD34^+ 줄기세포는 세포 복잡성이 낮은 둥근 모양이다.

<83> $\text{CD34}^+ \text{CD45}^-$ 태반 줄기세포를 함유하는 태반 줄기세포군은 다른 CD34^+ 세포군, 예를 들어 $\text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ 세포 및/또는 $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ 세포의 세포군을 포함할 수도 있다. 한 구체적인 태양에서, 상기 $\text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ 세포는 $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{lin}^-$ 세포를 포함한다. 다른 구체적 실시 태양에서, 상기 CD34^+ 태반 줄기세포는 ALDH^+ 인 세포, 즉 CD34^+ , ALDH^+ 태반 줄기세포를 포함한다.

<84> 다른 실시 태양에서는 CD34^+ , CD45^- 태반 줄기세포를 다른 세포 유형의 줄기세포와 조합한다. 한 실시 태양에서, 상기 다른 유형의 줄기세포는 OCT-4^+ 또는 ABC-p^+ 인 부착성 태반 줄기세포를 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서 상기 부착성 태반 줄기세포는 OCT-4^+ 이고 ABC-p^+ 인 세포를 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서, 상기 조혈성 태반 줄기세포는 적혈구와 세포 파편을 실질적으로 가지고 있지 않은 태반 관류물 속에 포함된다.

<85> 다른 실시 태양에서, $\text{CD34}^+ \text{CD45}^-$ 태반 줄기세포 등의 조혈성 태반 줄기세포와 조합하는 상기 부착성 태반 줄기세포는 표지 CD10 , CD29 , CD44 , CD54 , CD90 , CD73 또는 CD105 중 하나 이상을 발현하고, 표지 CD34 , CD38 , CD45 , SSEA3 과 SSEA4 중 하나 이상의 발현이 없는 세포를 포함한다. 다른 실시 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 표지 CD10 , CD29 , CD44 , CD54 , CD90 , CD73 또는 CD105 에 대하여 양성이고, 표지 CD34 , CD38 , CD45 , SSEA3 과

SSEA4에 대하여 음성인 세포를 포함한다. 다른 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 표지 CD10, CD29, CD44, CD54, CD90, CD73과 CD105 중 하나 이상을 함유하고, 표지 CD34, CD38, CD45, SSEA3과 SSEA4 중 하나 이상을 결여하는 세포를 포함한다. 다른 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 표지 CD10, CD29, CD44, CD54, CD90, CD73과 CD105에 대하여 양성이고, 표지 CD34, CD38, CD45, SSEA3과 SSEA4에 대하여 음성인 세포를 포함한다. 다른 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD34⁻ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD34⁻CD38⁻ 태반 줄기세포이다. 다른 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD10, CD29, CD33, CD44, CD73, CD105, CD117과 CD133 중 적어도 하나에 대하여 양성이고 CD34 또는 CD45 중 적어도 하나에 대하여 음성인 세포를 함유한다. 다른 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD10, CD29, CD33, CD44, CD73, CD105, CD117과 CD133에 대하여 양성이고 CD34 또는 CD45에 대하여 음성인 세포를 함유한다. 더 구체적인 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 HLA-ABC⁺인 세포를 함유한다. 한 더 구체적인 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 HLA-ABC⁻인 세포를 함유한다. 한 더 구체적인 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 HLA-DR⁺인 세포를 함유한다. 더 구체적인 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 HLA-DR⁻인 세포를 함유한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺인 세포를 함유한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD200⁺이고 HLA-G⁺인 세포를 함유한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD73⁺, CD105⁺이고 CD200⁺인 세포를 함유한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD200⁺이고 OCT-4⁺인 세포를 함유한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD73⁺, CD105⁺인 세포를 함유하는데, 이러한 세포들은 이 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군을 배아유사체(embryoid-like body)의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 상기 분리된 태반 세포군이 배아유사체를 형성하도록 촉진한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 세포를 함유한다. 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 태반 줄기세포는 OCT-4⁺인 세포를 함유하는데, 이러한 줄기세포들은 이 세포를 함유하는 분리된 태반 세포군을 배아유사체(embryoid-like body)의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 상기 분리된 태반 세포군이 배아유사체를 형성하도록 촉진한다.

<86> 다른 실시 태양에서, 상기 다른 유형의 줄기세포군은 제대혈 줄기세포 및/또는 골수 줄기세포를 함유한다.

<87> CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포와 그와 조합을 다른 줄기세포는 HLA가 동일하게 일치, 즉 같은 개체로부터 유래한 것일 수 있다. 다른 태양에서, 상기 CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포와 다른 줄기세포는 HLA 불일치, 즉 서로 다른 개체로부터 유래한 것일 수 있다. CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포와 다른 줄기세포의 조합은 원하는 수용자와 HLA-일치, 부분적으로 HLA-일치 및/또는 HLA-불일치하는 줄기세포를 포함할 수 있다. 제대혈 또는 제대혈 유래 줄기세포를 함유하는 통합 줄기세포군에서, 이 세포군은 수용 대상에 대하여 HLA 일치이거나, HLA 부분 일치 또는 HLA 불일치하는 줄기세포를 함유할 수도 있다. 비제대혈 줄기세포를 함유하는 조합 줄기세포군에 있어서, 최소한 상기 다른 줄기세포는 원하는 수용 대상에 대하여 HLA 일치하거나 부분적으로 HLA 일치하는 것이 바람직하다.

<88> 다양한 실시 태양에서, CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포의 상기 다른 줄기세포에 대한 비율은 각 세포군 속의 총 유효 세포의 수 또는 줄기세포의 총수를 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 1:100,000,000 일 수 있다. 여러 바람직한 실시 태양에서, 이 비율은 약 1:10 내지 약 10:1 또는 약 3:1 내지 1:3이다.

<89> 나아가 본 명세서에서는 CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포와 다른 줄기세포를 함유하는 줄기세포군을 제공하는데, 여기서 상기 줄기세포군은 CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포, 상기 다른 줄기세포 또는 양쪽 모두를 치료적 유효량으로 함유한다. 여러 세포 조합에서 이 세포군은 적어도 1×10⁴, 5×10⁴, 1×10⁵, 5×10⁵, 1×10⁶, 5×10⁶, 1×10⁷, 5×10⁷, 1×10⁸, 5×10⁸, 1×10⁹, 5×10⁹, 1×10¹⁰, 5×10¹⁰ 또는 1.0×10¹¹개의 CD34⁺CD45⁻ 태반 줄기세포, 상기 다른 유형의 줄기세포 또는 양쪽 세포를 함유하거나, 1×10⁴, 5×10⁴, 1×10⁵, 5×10⁵, 1×10⁶, 5×10⁶, 1×10⁷, 5×

10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} 또는 1.0×10^{11} 개 이하의 $CD34^+CD45^-$ 태반 줄기세포, 다른 유형의 줄기세포 또는 양쪽 세포를 함유하거나, 아니면 상기 태반 줄기세포군과 상기 다른 유형의 줄기세포 양쪽 모두로부터 유래한 총 유핵세포를 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 단위 또는 이상 포함한다.

<90> **4. 태반 줄기세포를 얻는 방법**

<91> **4.1 줄기세포 수집용 조성액**

<92> 본 명세서에서 제공하는 방법과 조성물에 쓰이는 태반 줄기세포, 예를 들어 부착성 태반 줄기세포 및/또는 $CD34^+$, $CD45^-$ 태반 줄기세포는 조직으로부터 세포를 수집하는데 이 분야에 알려진 모든 수단, 예를 들어 태반의 관류 및/또는 태반 조직의 물리적 및/또는 효소적 파괴를 이용하여 수집할 수 있다. 일반적으로, 줄기세포는 생리학적으로 적합한 용액, 예를 들어 줄기세포 수집용 조성액(stem cell collection composition)을 이용하여 포유류 태반으로부터 얻게 된다. 한 가지 줄기세포 수집용 조성액은 2006년 12월 28일자 출원된 미국 출원 공보 제2007/0190042호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 자세하게 기재되어 있다.

<93> 이 줄기세포 수집용 조성액은 줄기세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 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.

<94> 줄기세포 수집용 조성액은 태반 줄기세포를 보존하는 성질이 있는 성분을 하나 이상 갖추고 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), 부신피질자극호르몬, 피질자극호르몬 방출 호르몬, 니트로프루시드나트륨(sodium nitroprusside), 히드랄라진(hydralazine), 아데노신 삼인산, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 인산디에스테르 가수분해 효소 억제제 등), 세포 피사 억제제(예를 들어 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노말레이미드, 디티오키르밤산피롤리딘 또는 클론아제팜), TNF- α 억제제 및/또는 산소 운반성 퍼플루오로카본(브롬화퍼플루오로옥틸, 브롬화퍼플루오로데실 등)을 들 수 있다.

<95> 줄기세포 수집용 조성액은 금속단백 분해효소, 세린 단백질 가수분해 효소, 중성 단백질 가수분해 효소, 리보핵산 가수분해효소, 디옥시리보핵산 가수분해 효소 등의 조직 분해 효소를 하나 이상 갖추고 있을 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.

<96> 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), 에리드로마이신, 페니실린(페니실린 V 등) 또는 퀴놀론(오플록사신(ofloxacin), 시프로플락신(ciproflaxin) 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.

<97> 줄기세포 수집용 조성액은 다음 화합물을 하나 이상 갖추고 있을 수 있다: 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 수산화 툴루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E), 환원제(예를 들어, 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, 아밀로리드헥사메틸렌, 아밀로리드디메틸 또는

아밀로리드이소부틸 약 1.0 μM 내지 약 5 μM).

<98> **4.2 태반의 수집과 취급**

<99> 일반적으로 사람 태반은 출산 후 태반을 압박 방출한 직후에 회수된다. 바람직한 실시 태양에서 이러한 태반은 환자의 완전한 병력을 얻은 후 이를 그 태반에 연관시키는 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, 사람 태반 줄기세포는 병력을 감안하여, 상기 태반에 관련된 신생아 또는 그 신생아의 부모, 형제나 다른 친척의 개인화된 의료(personalized medicine)에 쓰일 수 있다.

<100> 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 카놀라(cannula)를 써서, 중력을 이용하여 태반을 실혈(exsanguination)하는 것이 전형적이다(Anderson의 미국 특허 제5,372,581호, Hessel 외 미국 특허 제5,415,665호를 보라). 이 바늘 또는 카놀라는 탯줄 정맥에 대개 놓이고 되고, 태반을 부드럽게 마사지하여 제대혈이 태반으로부터 빠져나오는 것을 돕는다. 이러한 제대혈 회수법은 상업적으로, 예를 들어 미국 뉴저지주 Cedar 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.

<101> 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℃로 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 미국특허 제7,147,626호 또는 미국 특허 출원공개 제2006/0060494호에 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.

<102> 줄기세포 수집 전에 태반을 멸균 조건에서 실온 또는 5~25℃의 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℃ 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 실혈된 태반의 저장 시간은 태반 줄기세포를 수집하기 36 시간 전을 넘기지 않는 것이 바람직하다.

<103> 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.

<104> **4.3 태반 조직의 물리적 파괴와 효소 소화**

<105> 한 실시 태양에서, 줄기세포는 물리적 파괴, 예를 들어 태반의 효소 소화에 의하여 포유류 태반으로부터 얻어진다. 본 발명에 따른 줄기세포 수집용 조성액에 접촉하고 있는 채로 이 태반 또는 그 일부분을 예를 들어, 갈거나, 잡아 떼거나, 저미거나, 네모난 조각으로 썰거나, 잘게 썰거나, 액체에 담가 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.

<106> 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. 제대 줄기세포들 또한 본 발명의 방법에 쓰일 수 있다. 특정 실시 태양에서, 태반 줄기세포는 양막과 융모막을 함유한 태반 조직에서 얻는다. 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 약 1000 mm²인 태반 조직의 덩어리를 파괴하여 얻는 것이 전형적인 경우이다.

<107> 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 태양에서는 히알루론산의 소화를 위하여 태반 조직의 효소 소화에서 금속단백 분해 효소, 중성 단백질 분해 효소와 점액 용해성(mucolytic) 효소의 조합을 사용하는데, 이를 태면 콜라겐 분해 효소, 디스파제와 히알루로니다제의 조합 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 가수분해효소와 트립신, 키모트립신 또는 엘라스타제 등의 세린 단백질 분해 효소를 들 수 있다. 세린 단백질 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.

<108> 조직 소화 효소의 모든 조합을 사용할 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°C에서 10 분 동안 0.25% 트립신으로 소화한다. 다른 효소를 사용한 다음 이어서 세린 단백질 분해 효소를 이용하는 것이 바람직하다.

<109> 다른 실시 태양에서 상기 줄기세포를 함유하는 상기 줄기세포 수집용 조성물 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.

<110> 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.

<111> **4.4 태반 관류**

<112> 태반 줄기세포는 또한 포유류 태반을 관류하여 얻을 수 있다. 포유류 태반을 관류하여 줄기세포를 얻는 방법, 예를 들어 Hariri의 미국 특허 제 7,045,148호와 미국 출원 공개 제2007/0190042호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 개시되어 있다.

<113> 태반 줄기세포는 관류로써, 이를 태면 관류 용액으로서 줄기세포 수집용 조성액을 이용하여 태반 혈관계를 관통하여 얻을 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(등록상표) 또는 플라스틱 재질 카늘라 등의 카늘라로 삽관될 수 있다. 이러한 살균된 연결부는 관류 매니폴드(manifold)에 연결된다.

<114> 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 있으며, 즉, 단지 태반 맥관 구조(태아 조직)를 통과하게 된다. 이것은 관류의 "폐쇄 순환(closed circuit)"으로 명명될 수 있다. 이 폐쇄 순환 관류 방법은, 일 태양에서, 다음과 같이 수행될 수 있다. 분만 후 태반이 출생 후 약 48시간 내에 얻어진다. 탯줄이 클램핑되고, 클램프 상단이 잘라진다. 탯줄은 버려질 수도 있고, 또는 예를 들어, 탯줄 줄기 세포와 같은 것을 회수하기 위하여 처리될 수도 있으며, 또는 생체물질(biomaterial)의 생성을 위해 탯줄 막을 처리하기 위해 이용될 수 있다. 양막(amniotic membrane)은 관류 동안 유지될 수도 있으며, 또는 예를 들어, 손가락으로 블런트(blunt) 절개하여 용모막으로부터 분리될 수도 있다. 양막이 관류 전에 용모막으로부터 분리된다면, 그것은 예를 들어 버려질 수도 있고, 예를 들어, 미국특허 출원 공개 제2004/0048796호에 개시된 것과 같은 생체물질과 같은 양막 생체물질을 생성하기 위하여, 또는 효소 소화에 의해 줄기 세포를 얻기 위하여 처리될 수도 있다. 예를 들어, 멸균 거즈를 사용하여 모든 육안으로 식별되는 혈액 덩어리 및 잔류 혈액이 태반으로부터 제거된 후에, 탯줄 혈관은 예를 들어, 탯줄의 교차 절단으로 탯줄 막을 부분적으로 절개함과 같은 방법으로 노출된다. 혈관은 확인되고, 예를 들어, 각 혈관의 절개 말단을 폐쇄 알리게이터 클램프(closed alligator clamp)로 들어올려 개봉된다. 예를 들어, 관류 장치 또는 연동운동 펌프에 연결된 플라스틱 튜브와 같은 기기가 그 후 각각의 태반 동맥에 삽입된다. 펌프는 예를 들어, 연동운동 펌프(peristaltic pump)와 같은 목적에 적합하면 어느 펌프든 사용될 수 있다. 예를 들어, 250 mL 수집 백과 같은 혈관 백과 같은 멸균 수집용 저장기구에 연결된 플라스틱 튜브는 그 후 태반 정맥으로 삽입된다. 대안적으로, 펌프에 연결된 튜브는 태반 정맥으로 삽입되고, 저장기구(들)에 연결된 튜브들은 태반 동맥 중 하나 또는 두 개에 삽입된다. 태반은 그 후 일정 부피의 관류 용액, 예를 들어, 약 750 ml의 관류 용액으로 관류된다. 관류액 내의 세포들은 그 후 예를 들어, 원심분리와 같은 방법으로 수집된다.

<115> 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.

<116> 실혈(exsanguination) 과정에서 포유류 태반으로부터 처음 얻은 관류액은 체대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구 때문에 색깔을 띠는 것이 일반적이다. 이 관류액은 관류가 진행됨에 따라서 색깔이 옅어지며, 잔류 체대혈 세포들은 태반에서 씻겨 나간다. 일반적으로 태반을 처음에 실혈하는데는 30에서 100 mL의 관류액이면 충분하지만 관측된 결과에 따라 관류액의 양을 가감할 수 있다.

<117> 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.

<118> 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, 위페린나트륨, 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)이나 스트렙토마이신(예를 들어 40~100 μ g/mL 농도로), 페니실린(예를 들어 40 단위/mL), 암포테리신 B(예를 들어 0.5 μ g/mL) 등의 항생제)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 오랫동안 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/mL 보다 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.

<119> 특정 이론에 구애받고자 하는 것은 아니지만, 태반을 실혈 후 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 씻어넣은 방식이 바람직하다. 분리된 태반을 관류하면 잔류 체대혈을 제

거할 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.

<120> 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 얻을 수 있는 태반 줄기세포 수보다 더 많다.

<121> 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 용모막, 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 디티오트레이톨과 2 mM 베타메르캅토에탄올을 함유하는 차가운 억제제 혼합물로 세척한다. 몇 분 후 줄기세포를 찬(예를 들어 4°C) 본 발명의 줄기세포 수집용 조성액으로 세척한다.

<122> 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.

<123> **4.5 태반 줄기세포의 분리, 분류와 특성 파악**

<124> 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×g로 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°C에서 20분 동안 약 1100×g로 원심분리되어, 세포의 저밀도 계면층을 후속 처리를 위하여 수집하게 된다.

<125> 세포 펠렛은 신선한 줄기세포 수집용 조성액 또는 줄기세포 유지에 적합한 배지, 예를 들어 2 단위/mL 헤파린과 2 mM EDTA를 함유한 IMDM 무혈청 배지(미국 뉴욕주 GibcoBRL)에 재현탁된다. 단핵 세포 총분획을 이를 태면 LYMPHOPREP(노르웨이 오슬로 Nicomed Pharma사) 등으로 제조사의 설명에 따라 분리한다.

<126> 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.

<127> 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% EDTA를 함유한 0.05% 트립신 용액(미국 미주리주 세인트루이스 Sigma사)을 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, 5~10×10⁶ 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% CO₂) 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.

<128> 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, 또는 빛이나 공초점 현미경을 이용한 세포 형태 분석 및/또는 PCR과 유전자 발현 분석(profiling) 등의 공지 기술을 이용한 유전자 발현 변화를 측정함으로써 감시할 수 있다. 이러한 방법은 하나 또는 그 이상의 특정 표지에 대하여 양성인 세포를 확인하는 데에도 쓰일 수 있다. 예를 들어 상기 방법에 따라 CD34에 대한 항체를 이용하면 어느 세포가 CD34를 측정 가능한 양으로 함유하는지 알 수 있는데, 그럴 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)에 대한 항체와 OCT-4와 같이 줄기세포에 특이적인 유전자의 서열은 이 분야에 잘 알려져 있다.

<129> 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 용이하게 하기 위하여 곧바로 96-웰 또는 384-웰 플레이트의 개별 웰 속으로 운반될 수 있다.

<130> 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 존부 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.

<131> 태반 줄기세포의 항체 매개 검출과 분류에 관하여는 어느 표지에 특이적인 항체라면 어떠한 것이든지 세포의 검출과 분류에 적합한 어떠한 형광 발색단이나 기타 표지와 함께라도 쓸 수 있다(예를 들어 형광 표지 세포 분리법(FACS)). 특정 표지에 특이적인 항체/형광 발색단 조합으로는 이소티오시안산플루오레사인 결합(FITC-conjugated) 모노클론 항체들로서 HLA-G(미국 노스캐롤라이나주 Raleigh의 Serotec으로부터 입수 가능), CD10(미국 캘리포니아주 산호세의 BD Immunocytometry Systems), CD44(미국 캘리포니아주 산호세의 BD Biosciences Pharmingen)와 CD105(미국 미네소타주 미니애폴리스의 R&D Systems Inc.)에 특이적인 항체들; 피코에리드린(PE) 결합 단일클론 항체로서 CD44, CD200, CD117 및 CD13에 대한 항체(BD Biosciences Pharmingen); 피코에리드린-Cy7(PE Cy 7) 결합 단일클론 항체로서 CD33과 CD10 에 대한 항체(BD Biosciences); 알로피코시아닌(APC) 결합 스트렙타비딘과 단일클론 항체로서 CD38에 대한 것(BD Biosciences Pharmingen); 그리고 바이오틴화 CD90(BD Biosciences Pharmingen)에 대하여 특이적인 항체들을 들 수 있지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 다른 항체/표지 조합으로 쓰일 수 있는 것에는 CD133-APC(Miltenyi), KDR-Biotin (CD309, Abcam), CytokeratinK-Fitc(Sigma사 또는 Dako사), HLA ABC-Fitc(BD), HLA DRDQDP-PE (BD), β-2-마이크로글로불린-PE(BD), CD80-PE(BD)과 CD86-APC(BD)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<132> 다른 항체/표지 조합에는 CD45-PerCP(퍼리딘 엽록소 단백질(peridinin chlorophyll protein)); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F(플루오레사인); HLA-G-F와 7-아미노-악티노마이신-D (7-AAD); HLA-ABC-F 등이 있지만, 여기에 한정되지는 않는다.

<133> 예를 들어 피코에리드린-Cy5(PE Cy5) 결합 스트렙타비딘과 CD117이나 CD133에 대한 바이오틴 결합 단일 클론 항체를 사용하여 태반 줄기세포를 CD117 또는 CD133에 대하여 분석할 수 있다. 그러나 이 시스템을 사용하면

상대적으로 배경값이 크기 때문에 세포가 각각 CD117 또는 CD133에 대하여 양성으로 나타날 수 있다.

- <134> 태반 줄기세포는 하나의 표지에 대하여 항체로 표지하고 검출 및/또는 분류할 수 있다. 태반 줄기세포를 또한 서로 다른 표지에 대한 여러 종류의 항체로 동시에 표지할 수도 있다.
- <135> 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.
- <136> 한편 세포 형태와 성장 특성을 바탕으로 하여 태반 세포를 특성화 및/또는 분류할 수 있다. 예를 들어 태반 세포를 배양시 섬유모세포 유사(fibroblastoid) 형상을 나타내는 것으로 그 특성을 파악 및/또는 섬유모세포 유사 형상을 가지는지 여부에 따라 선별할 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 및 CD105를 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.
- <137> 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, MESENCULT(캐나다 브리티시 콜럼비아 주 밴쿠버의 Stem Cell Technologies, Inc.의 상표) 배양 배지를 예로 들 수 있다.
- <138> 태반 줄기세포의 생존능, 증식 잠재성과 수명은 이 분야에 알려진 표준적인 기법을 이용하여 평가할 수 있는데, 이들 기법의 예는 다음과 같다: 트리판블루 배제 분석, 디아세트산플루오레사인 흡수 분석, (생존능 평가를 위한)요오드화프로피듐 흡수 분석, 티미딘 흡수 분석, (증식을 평가하는) MTT 세포 증식 분석(ATCC). 수명도 이 분야에 잘 알려진 방법, 예를 들어 장기 배양시 세포군 배증의 최대값을 측정하는 방법으로 알아낼 수 있다.
- <139> 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.
- <140> **5. 태반 줄기세포의 배양**
- <141> **5.1 배양 배지(Culture media)**
- <142> 분리된 태반 줄기세포 또는 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포가 자라나오는 태반 조직은 세포 배양을 개시하거나 과중하는데 쓰일 수 있다. 세포는 무균 조직 배양 용기로 옮겨지는데, 이 용기는 표면이 라미닌, 콜라겐(예를 들어 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴과 세포외 막 단백질(미국 매사추세츠 주 Bedford의 BD Discovery Labware사의 MATRIGEL)과 같은 세포외 매트릭스 또는 리간드로 피복되거나 피복되지 않을 수 있다.
- <143> 이 분야에서 줄기세포 배양 용도로 적합하다고 인정받은 모든 배양 배지 또는 배양 조건을 이용하여 태반 줄기세포를 배양할 수 있다. 배양 배지는 혈청을 함유하는 것이 바람직하다. 태반 줄기세포는 예를 들어 다음 배양 배지를 이용할 수 있다: ITS(인슐린-트랜스페린-셀렌), LA+BSA(리놀레산+소 혈청 알부민), 포도당, L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-I와 페니실린/스트렙토마이신 함유 DMEM-LG(Dulbecco's Modified Essential Medium, 저포도당)/MCDB 201(병아리 섬유모세포 기저(basal) 배지),
- <144> 10% 소 태아 혈청(FBS) 함유 DMEM-HG(고포도당),
- <145> 15% FBS 함유 DMEM-HG,

- <146> 10% FBS, 10% 말 혈청과 하이드로코르티손 함유 IMDM (Iscove 변형 Dulbecco 배지),
- <147> 10% FBS, EGF와 헤파린 함유 M199,
- <148> 10% FBS, 글루타맥스(상표)와 겐타마이신 함유 α -MEM(최소 필수 배지),
- <149> 10% FBS, 글루타맥스와 겐타마이신 함유 DMEM 등.
- <150> 바람직한 배지는 2% FBS, ITS, LA+BSA, 포도당, L-아스코르브산, PDGF, EGF와 페니실린/스트렙토마이신 함유 DMEM-LG/MCDB-201이다.
- <151> 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.
- <152> 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, 말 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-1), 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. 그리고 하나 이상의 신경 외배엽 특정 인자(neuroectoderm specification factor), 예를 들어 소닉 헤지호그(sonic hedgehog, shh) 및/또는 레티논산(retinoic acid, ra)으로 배지를 보충할 수 있다.
- <153> 태반 줄기세포는 표준적 조직 배양 조건, 예를 들어 조직 배양 접시나 다중웰 플레이트에서 배양할 수 있다. 태반 줄기세포를 매달린 배지 방울법(hanging drop)으로 배양할 수도 있다. 이 방법에서는 태반 줄기세포를 약 5 mL 배지 속에 약 1×10^4 세포/mL 밀도로 현탁하고 이 배지 한 방울 또는 여러 방울을 조직 배양용기, 예를 들어 100 mL 들이 페트리 접시 뚜껑의 내면에 놓는다. 이 방울들은 예를 들어 한 방울이거나 여러 방울, 예를 들어 다중 채널 피펫터(multichannel pipetter)에서 온 것일 수 있다. 이 뚜껑을 조심스레 뒤집고 상기 접시 바닥에 놓는데, 이 접시 바닥에는 소정량의 액체, 예를 들어 접시 환경 속의 수분 함량을 유지하기에 충분한 멸균 PBS가 있고 여기서 줄기세포를 배양한다.
- <154> 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포의 표현형을 미분화 상태로 유지하게 하는 화합물의 존재 하에서 상기 태반 줄기세포를 배양한다. 어떠한 실시 태양에서는 이 화합물이 치환 3,4-디하이드로피리디놀[4,5-d]피리미딘이다. 더 구체적인 태양에서는 이 화합물이 아래 화학 구조식의 화합물이다.



- <155>
- <156> 이 화합물에 태반 줄기세포, 태반 줄기세포군을 예를 들어 농도 약 1 μ M에서 약 10 μ M로 접촉시킬 수 있다.
- <157> **5.2 태반 줄기세포의 증폭과 증식**
- <158> 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 이르면 충분한 시간, 즉 이 줄기세포와 그 자손이 조직 배양 용기 표면적의 70~90%를 차지할 때까지 배양할 수 있다.
- <159> 태반 줄기세포는 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 과종할 수 있다. 예를 들어 이 세포들을 낮은 밀도(예를 들어 1 cm^2 당 약 1000에서 약 5000 세포) 내지 높은 밀도(1 cm^2 당 약 50,000 세포 또는 그 이상)로 과종

할 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.

<160> 70%~90% 세포 함유를 이룬 다음에는 이들 세포를 계대할 수 있다. 예를 들어, 공지 기술을 이용하여 이들 세포를 효소 처리, 이를 태면 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 명세서에서는 또한 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.

<161> **5.3 태반 줄기세포군**

<162> 한 측면에서는 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군을 분화된 세포, 예를 들어 간세포 및/또는 간 형성성 세포 또는 연골세포 및/또는 연골 발생(chondrogenic) 세포의 세포원으로 이용할 수 있다. 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 명세서에서 기술하는 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.

<163> 본 명세서에서 제공하는 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.

<164> 나아가 본 명세서에서는 분리된 태반 줄기세포군을 생산하는 방법을 제공하는데, 예를 들어 효소 소화인지 관류 유래인지 무관하게, 특정 표지 및/또는 특정 배양 또는 형태적 특성을 나타내는 태반 줄기세포를 선별함으로써 제공한다. 예를 들면 이러한 태반 줄기세포를 이용하여 간세포 및/또는 간 형성성 세포 또는 미분화 태반 줄기세포와 태반 줄기세포로부터 분화된 간 형성성 세포 및/또는 간세포 사이의 혼합 세포군 또는 연골세포 및/또는 연골 발생 세포 혹은 미분화 태반 줄기세포와 연골세포 및/또는 연골 발생 세포 사이의 혼합 세포군을 생산할 수 있다.

<165> 태반 줄기세포를 함유하는 세포군은 서로 다른 다양한 방법을 통하여 생산할 수 있다. 예를 들어 본 명세서 한 실시 태양에서는, (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 HLA-G를 발현하고 세포를 선택하고 상기 세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성함으로써 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 생산한다. 본 명세서의 다른 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하는 세포를 선택하는 단계와 상기 세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 생산 방법을 제공한다. 본 명세서의 다른 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 OCT-4를 발현하는 세포를 선택하는 단계와 상기 세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 생산 방법을 제공한다. 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73과 CD105를 발현하고, (c) 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체 형성을 촉진하는 세포를 선택하는 단계와 상기 세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 생산 방법을 제공한다. 다른 실시 태양에서는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 HLA-G를 발현하는 세포를 선택하는 단계와 상기 세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 생산 방법을 제공한다. 본 명세서의 다른 태양에서는 세포군의 생산 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 기질에 부착하면서 (b) OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체 형성을 촉진하는 세포를 선택하는 단계와 상기 세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다. 전술한 상기 태양 중 어느 것이라도 ABC-p(태반 특이적 ABC-전달 단백질, 예를 들어, Allikmets 외, *Cancer Res.* 58(23):5337~5339(1998)을 보라)를 발현하는 태반 세포를 선택하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한 이 방법은 예를 들어, 중간엽 줄기세포

에 특이적인 특징, 예를 들어 CD29의 발현, CD44의 발현, CD90의 발현 또는 이들의 조합 발현을 적어도 하나 나타내는 세포를 선택하는 것도 포함할 수 있다.

<166> 전술한 세포군의 생산 방법 실시 태양을 통하여 얻은 세포군 중 어느 것에 대하여서도 세포 또는 세포군이 예를 들어 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 또는 연골 발생 세포를 생산하는 능력이 있는지 여부를 추가적으로 평가할 수 있다.

<167> 이 명세서의 실시 태양에서, 기질은 예를 들어, 태반 줄기 세포의 배양 및/또는 선별을 할 수 있는 모든 표면이다. 전형적인 경우에, 이 기질은 플라스틱, 예를 들어 조직 배양 접시 또는 다중웰 플레이트의 플라스틱이다. 조직 배양 플라스틱은 예를 들어, 라미닌 또는 피브로넥틴 등의 생분자로 피복될 수 있다.

<168> 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 캠브리지 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.

<169> 분리된 태반 줄기세포군은 줄기세포가 아닌 태반 세포나 태반 세포가 아닌 세포를 함유할 수 있다.

<170> 분리된 태반 줄기세포군을 하나 이상의 비줄기세포 또는 비태반 세포 세포군과 혼합할 수 있다. 예를 들어 분리된 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.

<171> 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.

<172> 본 명세서에서 제공하는 조성물, 방법과 관련하여 사용할 수 있는 다른 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군은 예를 들어, 미국 특허 출원 제11/648,813호와 미국 예비 출원 제60/846,641호에서 기술하고 있는데, 그 내용 전부는 인용에 의하여 본 명세서에 포함된다.

<173> **5.4. 간세포로의 분화 유도**

<174> 태반 줄기세포를 간세포로 분화하는 것은 예를 들어 태반 줄기세포를 간 세포로 분화 유도하는 세포 배양 조건에 놓음으로써 이를 수 있다. 어느 한 실시 태양에서는 이 태반 줄기세포가 간세포 또는 간 형성성 세포의 특징을 하나 이상 나타내는데 충분한 시간 동안 부티르산나트륨으로 이 태반 줄기세포를 접촉한다.

<175> 간 형성성 배지(hepatogenic medium)의 한 예에서는 부티르산나트륨을 보충한 DMEM이 포함된다. 세포는 예를 들어 14~28일 동안 배양하며, 3~4일마다 배지를 갈아준다. 분화는 예를 들어 사이토케라틴 18의 생산량이 (미분화 태반 줄기세포와 비교할 때) 증가하였다는 것을 측정하여 확인할 수 있다. 랩나 줄기세포는 사이토케라틴 18을 발현하지만 간세포가 발현하는 다른 사이토케라틴 중 적어도 하나를 발현하지 않는 것이 전형적인 경우이다. 분화를 또한 탈시알기당단백질(asialoglycoprotein) 수용체, 알파-1-안티트립신, 알부민과 사이토크롬 P450 활성 중 하나 이상의 존재로부터 확인할 수도 있다. 태반 줄기세포가 이들 특성 중 하나 이상을 나타내면

간세포로 분화한 것으로 본다.

<176> 본 명세서의 한 측면에서는 분리된 간세포 및/또는 간 형성성 세포군을 생산하는 방법을 제공하는데, 예를 들어 효소 소화인지 관류 유래인지 무관하게, 특정 표지의 발현 및/또는 특정 배양 과정이나 형태적인 특성을 나타내는 태반 줄기세포를 선별하고 이러한 세포를 상기 태반 줄기세포의 적어도 일부가 간세포 및/또는 간 형성성 세포로 분화하게 하는 조건에 처하게 하는 방법이다. 예를 들면 본 명세서에는 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 생산하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (1) 태반 세포를 선별하는 단계를 포함하되, 여기서 상기 태반 세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나, CD73, CD105와 CD200을 발현하거나, CD200과 OCT-4를 발현하거나 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 혹은 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나, 아니면 OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다. 이어서 (2) 상기 태반 세포를 여타 태반 세포로부터 분리하고, 충분한 수의 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 생산할 때까지 상기 세포를 부티르산나트륨에 노출시킨다. 어떠한 실시 태양에서는 이 태반 줄기세포가 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺이다.

<177> 전술한 방법의 여러 가지 특정 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 혹은 적어도 그 만큼이 상기 간세포 및/또는 간 형성성 세포로 분화한다. 전술한 모든 방법들의 또 다른 특정 태양에서는 이 태반 세포들을 부티르산나트륨에 충분한 시간 동안 노출시켜, 상기 복수의 세포들로 하여금 미분화 태반 줄기세포와 비교하여 사이토케라틴 18의 생산량을 검출 가능하게 늘리거나, 탈시알기당단백질 수용체의 양을 검출 가능하게 늘리거나, 검출 가능한 수준의 사이토크롬 P450 7A1 활성을 나타내거나, 검출 가능한 양의 알부민을 나타내거나 또는 알부민을 암호화하는 유전자의 발현을 검출 가능하게 나타내도록 한다.

<178> **5.5 연골세포성(chondrocytic) 세포로의 분화 유도**

<179> 태반 줄기세포의 연골 발생 분화는 예를 들어 태반 줄기세포를 연골세포로 분화하도록 유도하는 세포 배양 조건 하에 놓음으로써 이룰 수 있다. 한 바람직한 연골세포 배지는 MSCGM(Cambrex)나 15% 제대혈 혈청으로 보강한 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM)이다. 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포 분액을 멸균 폴리프로필렌 튜브 속에 넣고 이를 원심분리(예를 들어 5분 동안 150×g)한 다음 불완전 연골 발생 배지(incomplete chondrogenesis medium)(Cambrex)로 두 번 씻어 준다. 이 세포를 TGF-β-3 0.01 μg/mL를 함유하는 완전 연골 발생 배지(Cambrex) 속에 mL 당 세포 약 1~20×10⁵개 농도로 재현탁한다. 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 아스코르브산 포함 또는 무포함하에 외래(exogenous) 성장 인자, 예를 들어 GDF-5나 전환 성장 인자 β3(TGF-β3)와 접촉시킨다.

<180> 연골 발생 배지의 다른 예는 DMEM, 1% FBS, 인슐린, 아스코르브산-2-인산과 TGF-β1을 함유한다. 비슷한 연골 발생 배지는 1 L에 DMEM, 1% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 37.5 μg/mL 아스코르브산-2-인산, ITS 프리믹스(예를 들어 인슐린 100 mg, 트랜스페린 100 mg과 셀렌산나트륨 100 pg 함유)와 10 ng/mL TGF-1을 함유한다. 연골 발생 배지의 다른 예는 100 nM의 텍사메타손과 10 ng/mL의 전환 성장 인자-β3(TGF-β3)를 포함하는 규정 배지(defined medium)이다(포유동물 세포 배양에 적절한 모든 표준적인 규정 배지).

<181> 연골 발생 배지는 프롤린과 글루타민을 비롯한 아미노산, 피루브산나트륨, 텍사메타손, 아스코르브산, 인슐린/트랜스페린/셀렌으로 보충할 수 있다. 연골 발생 배지는 수산화나트륨 및/또는 콜라겐으로 보충할 수도 있다.

<182> 부착성 태반 줄기세포는 고밀도 또는 저밀도로 배양할 수 있다. 세포를 혈청 없이 배양하는 것이 바람직하다. 태반 줄기세포를 연골 발생 조건하에서 정적으로 또는 동적으로 배양할 수 있는데, 예를 들어 배지가 세포 주위를 순환하도록 하여 배양할 수 있다. 세포 배양은 검출 가능한 정도의 세포 분화가 일어날 때까지 진행할 수 있다. 어느 실시 태양에서는 부착성 태반 줄기세포를 연골 발생 조건에서 약 28일에서 약 56일 동안 배양한다.

<183> 부착성 태반 줄기세포를 전기 방사 부직포 미세섬유(microfibrous) 또는 나노섬유 매트 위에 피종하고 그 세포를 연골 발생 조건에서 배양함으로써 연골세포 또는 연골세포성 세포로 분화 유도할 수 있다. 이러한 매트와 그 제조 방법은 본 명세서 발명의 상세한 설명 7.1.4에 기재하고 있다.

<184> 연골 발생은 다음과 같이 평가할 수 있는데, 예를 들어 호산성 바탕질(eosinophilic ground substance)의 생산

관찰, 글리코사미노글리칸발현에 대한 사프라닌-0(safranin-0) 염색, 글리코사미노글리칸 발현 측정을 위한 메틸렌블루 염료 결합, 헤마톡실린/오신(hematoxylin/eosin) 염색 세포 형태 평가 및/또는 콜라겐 2와 콜라겐 9 유전자 발현의 RT/PCR 확인 또는 염색이 있다. 연골 발생은 줄기세포 펠렛 속에서, 예를 들어 줄기세포의 현탁액을 부드럽게 원심분리(예를 들어 약 5분 동안 약 800g)하여 얻은 펠렛 속에서 키움으로써 관찰할 수도 있다. 약 1-28일 뒤 상기 줄기세포 펠렛은 튼튼한 매트릭스를 형성하기 시작하고 유도되지 않은 세포주나 연골 발생성이 아닌 세포주에서는 볼 수 있는 구조적 강도를 지니는데, 유도되지 않거나 연골 발생성이 아닌 세포주의 펠렛은 약간 힘을 가하면 부서지는 경향이 있다. 연골 발생은 또한 예를 들어, 이러한 세포 펠렛을, 시리우스 레드(Sirius red) 등의 콜라겐을 염색하는 염료 및/또는 알시안 블루(alcian blue, Alcian blue 8GX, Ingrain blue 1 또는 C.I. 74240이라고도 불림) 등의 글리코사미노글리칸(GAG)을 염색하는 염료로 염색하여 증명할 수도 있다. 태반 줄기세포가 이들 특성 중 하나 이상을 나타내면 연골세포성 세포로 분화한 것으로 본다. 그리고 연골 발생의 평가로서 유전자 발현을 측정할 수도 있는데, 예를 들어 실시간 PCR로 초기 연골 발생 표지인 피브로모듈린(fibromodulin)과 연골 올리고머 매트릭스 단백질, 중기 연골 발생 표지인 어그리칸(aggrecan), 베르시칸(versican), 데코린(decorin)과 바이글리칸(biglycan), 그리고 성숙한 연골세포의 표지인 제II형과 X형 콜라겐을 발현을 살핀다.

<185> **5.6 태반 줄기세포의 보존**

<186> 태반 줄기세포와 그로부터 분화한 세포, 예를 들어 간세포 및/또는 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포는 보존될 수 있는데, 요컨대 장기 저장을 허용하는 조건 또는 세포 자멸사 또는 세포 괴사 등에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건하에 둘 수 있다.

<187> 태반 줄기세포와 그로부터 분화한 세포, 예를 들어 간세포 및/또는 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포는 예를 들어 2006년 12월 28일자의 관련 미국 출원 제11/648,812호 "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 명세서의 한 실시 태양에서는, 세포군, 예를 들어 태반 줄기세포 및/또는 간세포 및/또는 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포, 그리고 이들로부터 분화한 세포의 세포군을 보존하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포들을 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 시간 동안 충분한 양으로 존재한다. 한 특정 태양에서 상기 세포 자멸사 억제제는 카스파제 억제제이다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 세포자멸사 억제제는 JNK 억제제이다. 더 특정한 실시 태양에서, 상기 JNK 억제제는 상기 세포의 분화 또는 증식을 조절하지 못한다. 다른 실시 태양에서 상기 줄기세포 수집용 조성액은 상기 세포자멸사 억제제와 상기 산소 운반성 퍼플루오로카본을 별도의 상 속에 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 세포와 접촉할 때 약 0°C 내지 약 25°C에 있다. 다른 더 특정한 실시 태양에서, 상기 세포자멸사 억제제와 상기 산소 운반성 퍼플루오로카본은 상기 세포와 접촉할 때 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 5°C에 있다. 다른 더 특정한 실시 태양에서, 상기 접촉은 상기 줄기세포군의 운송시 이루어진다. 다른 더 특정한 실시 태양에서, 상기 접촉은 상기 줄기세포군의 냉동과 해동시에 이루어진다.

<188> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포와 그로부터 분화한 간세포 및/또는 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포의 세포군 보존 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포군을 세포 자멸사 억제제와 장기 보존용(organ-preserving) 화합물에 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 상기 세포자멸사 억제제는 상기 세포자멸사 억제제로 처리하지 않은 세포군과 비교하였을 때 상기 세포군의 세포자멸사를 방지하거나 감소시키는데 충분한 시간 동안 충분한 양으로 존재한다. 특정 실시 태양에서 상기 장기 보존용 화합물은 UW 용액(VIASPAN(등록상표))으로도 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 상 속에 또는 유탁액 형태로 더 포함한다.

<189> 본 방법의 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 관류시 세포 자멸사 억제제, 산소 운반성 퍼플루오로카본, 장

기 보존용 화합물 및 이들의 조합을 함유하는 줄기세포 수집용 조성액과 접촉시킨다. 다른 실시 태양에서는 상기 세포를 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 조성액에 접촉시킨다.

<190> 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.

<191> 본 명세서에서 제공하는 조성물과 방법에 쓰이는 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 이론테면 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.

<192> **7. 태반 줄기세포의 용도**

<193> **7.1 태반 줄기세포 함유 조성물**

<194> 본 명세서에서 기술하는 방법에서는 태반 줄기세포 또는 그들로부터 얻은 생분자를 함유하는 조성물을 사용할 수 있다. 마찬가지로 방식으로 본 명세서에서 기술하는 복수의 태반 줄기세포와 줄기세포군은 예를 들어 연구 또는 치료 용도에 사용하기 위하여, 생리학적으로 적합 또는 의학적으로 적합한 모든 화합물, 조성물 또는 장치와 결합하여 쓰일 수 있다.

<195> **7.1.1 냉동보존된 태반 줄기세포**

<196> 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포군은 장래의 사용을 위하여 보존, 예를 들어 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.

<197> 냉동보존된 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.

<198> 냉동 보존된 태반 줄기세포군은 예를 들어, 용기에 담긴 태반 줄기세포를 함유하는 조성물의 형태일 수 있다. 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 전에 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 유

형이 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.

7.1.2 약학 조성물

<199>

<200> 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. 태반 줄기세포를 함유하는 본 명세서에서 제공하는 약학 조성물은 상기 태반 줄기세포군 또는 본 명세서에서 언급한 태반 줄기세포 유형 중 아무것이나 함유하여도 좋다. 본 약학 조성물은 태아, 모체 또는 양쪽 태반 줄기세포를 모두 갖추고 있을 수 있다. 본 약학 조성물은 나아가 단일 기증자 또는 그 태반이나 여러 기증자 또는 그 태반들에서 유래한 태반 줄기세포를 포함할 수 있다.

<201>

본 약학 조성물은 중앙 세포 억제성 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.

<202>

본 약학 조성물은 세포 생존률이 50% 이상(즉 세포군 속의 세포 중 적어도 50%가 기능을 발휘하거나 살아 있음)인 세포군을 포함할 수 있다. 적어도 세포군 속 세포의 60%가 생존하고 있는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 상기 약학 조성물 속 세포군 세포의 생존률이 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%이다.

<203>

본 명세서에서 제공하는 약학 조성물은 생착(engraftment)을 촉진하는 화합물(예를 들어 항-T세포 수용체 항체, 면역 억제제 등), 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 등의 안정제를 하나 이상 포함할 수 있다.

7.1.3 태반 줄기세포의 조건 배지

<204>

<205> 본 발명의 태반 줄기세포를 이용하여 중앙 세포 억제성 조건 배지(conditioned medium), 즉 상기 줄기세포가 분비 또는 배설하는 생분자로서, 한 종류 또는 여러 종류인 복수의 중앙 세포에 대하여 측정 가능한 중앙 세포 억제 효과를 가지는 생분자를 하나 이상 함유하는 배지를 제조할 수 있다. 많은 실시 태양에서, 이 조건 배지는 태반 줄기세포가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 더 오랫동안 성장한 배지를 포함하고 있다. 다른 실시 태양에서 조건 배지는 태반 줄기세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 세포 함유하거나 100% 세포 함수에 이른 배지를 포함하고 있다. 이러한 조건 배지는 별도의 태반 줄기세포군 또는 다른 종류의 줄기세포의 배양을 지원할 수 있다. 다른 실시 태양에서 조건 배지는 태반 줄기세포가 성체 세포 유형으로 분화한 배지를 포함하고 있다. 다른 실시 태양에서 본 조건 배지는 태반 줄기세포와 비태반 줄기세포가 배양된 배지를 포함한다.

<206>

따라서 본 명세서의 한 실시 태양에서는 배양 배지, 예를 들어 부착성 태반 줄기세포 배양물로부터 얻은 조건 배지를 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 상기 부착성 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,

<207>

OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는데, 이때 상기 태반 줄기세포 배양은 상기 배지 속에서 24시간 이상 이루어진 것이다. 한 특정 태양에서 상기 조성물은 $CD34^+$, $CD45^-$ 태반 줄기세포의 조건 배지를 함유한다. 다른 어느 태양에서 이 조성물은 복수의 상기 태반 줄기세포, 예를 들어 복수의 부착성 태반 줄기세포 및/또는 복수의 비부착성 $CD34^+$, $CD45^-$ 태반 줄기세포를 더 함유한다. 또 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 조혈 전구세포와 같은 비태반 세포원에서 유래한 조혈 전구세포를 포함한다. 상기 비태반 세포는 또한 다른 줄기세포, 예를 들어 골수 유

래 중간엽 줄기세포와 같은 중간엽 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.

<208> 다른 실시 태양에서는 조건 배지가 태반 줄기세포에서 분화한 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골 세포성 세포의 조건 배지이거나, 그러한 배지를 함유한다. 이러한 세포군에는 태반 줄기세포, 태반 줄기세포에서 분화한 간 형성성 세포 또는 연골 발생 세포, 태반 줄기세포에서 분화한 간 세포 또는 연골 세포 혹은 전술한 세포의 모든 조합을 포함할 수 있다. 따라서 본 명세서의 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포에서 분화한 간 세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포의 배양에서 얻은 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공하는데, 여기서 상기 부착성 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, OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는데, 이때 상기 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골 발생성 세포의 배양은 상기 배지 속에서 24시간 이상 이루어진 것이다. 한 특정 태양에서 상기 조성물은 복수의 상기 태반 줄기세포를 함유한다. 다른 어느 태양에서 이 조성물은 복수의 비태반 세포, 예를 들어 초대 배양물로부터의 간세포, 간세포 세포주의 세포, 간암 세포 등을 함유한다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 비태반 세포가 조혈 전구세포 등의 CD34⁺ 세포, 예를 들어 말초 혈액 조혈 전구세포, 제대혈 전구세포 또는 태반 혈액 조혈 전구세포를 포함한다. 상기 비태반 세포는 또한 다른 줄기세포, 예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포와 같은 중간엽 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.

<209> **7.1.4 태반 줄기세포를 함유하는 매트릭스**

<210> 본 명세서의 다른 측면에서는 매트릭스, 하이드로겔, 스캐폴드 등을 제공하는데, 이들은 본 명세서에서 기술하는 부착성 태반 줄기세포로부터 분화한 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포의 세포군을 함유한다.

<211> 태반 줄기세포 또는 태반 줄기세포로부터 분화한 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포는 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, 용모막, 실질적으로 건조한 용모막, 실질적으로 건조한 양막과 용모막 등을 들 수 있다. 태반 줄기세포를 파종할 수 있는 바람직한 태반 생물질은 Hariri의 미국 출원 공보 제2004/0048796호에 기재되어 있다.

<212> 태반 줄기세포 또는 태반 줄기세포로부터 분화한 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포는 예를 들어, 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 세포를 함유하는 하이드로겔 용액을, 예를 들어 틀 속에서 굳혀서 착상(implantation)을 위하여 그 속에 세포를 함유하는 매트릭스를 형성할 수 있다. 이러한 매트릭스 속의 세포를 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 이룰 수 있다. 하이드로겔 형성 물질로는 알긴산과 그 염과 같은 다당류, 펩티드, 폴리포스파진(polyphosphazine)과 폴리아크릴레이트 등 이온결합으로 가교되는 것들 혹은 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체와 같이 각각 온도, pH에 의하여 가교되는 블록 공중합체를 들 수 있다. 몇몇 실시 태양에서 상기 하이드로겔 또는 매트릭스는 생분해성이다.

<213> 몇몇 실시 태양에서는 상기 제형에 제자리(*in situ*) 중합성 겔이 포함된다(예를 들어 미국 특허 출원공보 제 2002/0022676호, Anseth 외, *J. Control Release*, 78(1~3):199-209 (2002) 또는 Wang 외, *Biomaterials*, 24(22):3969~80(2003)을 보라).

<214> 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 메

트아크릴산의 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.

- <215> 상기 태반 줄기세포 또는 상기 태반 줄기세포로부터 분화한 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포를, 혹은 이들의 공배양물을 3차원 구조 또는 스캐폴드에 파종한 다음 생체 내에서 착상(implant)시킬 수 있다. 이러한 구조는 하나 이상의 모든 성장 인자, 세포, 약물 혹은 조직 형성을 촉진시키는 다른 성분과 조합함으로써 착상될 수 있다.
- <216> 쓰일 수 있는 3차원 스캐폴드의 예로는 부직 매트, 다공성 폼알 또는 자가 조립 펩티드를 들 수 있다. 부직 매트 는 글리콜산과 락트산의 합성 흡수성 공중합체(PGA/PLA 등)를 포함하는 섬유(미국 뉴저지주 Somerville의 Ethicon Inc.사의 Vicryl)로부터 만들 수 있다. 폼알은 예를 들어 동결건조 또는 냉동 진공건조(미국 특허 제 6,355,699호 등을 보라)와 같은 공정에 의하여 제조된 폴리(ϵ -카프롤락톤)/폴리(글리콜산)(PCL/PGA) 공중합체로 구성된 폼알을 3차원 스캐폴드로 쓸 수도 있다.
- <217> 다른 실시 태양에서는 이 스캐폴드가 나노섬유 스캐폴드(nanofibrous scaffold), 예를 들어 전기 방사(electrospun) 나노섬유 스캐폴드이거나 이를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서는 이 나노섬유 스캐폴드가 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리락트산글리콜산(poly lactic glycolic acid, PLGA), 제I형 콜라겐, 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE), 폴리(카프롤락톤), 폴리(L-락타이드-공중합- ϵ -카프롤락톤)[P(LLA-CL)](예를 들어 75:25) 및/또는 폴리(3-히드록시부티르산-공중합-3-히드록시발레르산)opoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)와 제I형 콜라겐의 공중합체를 함유한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 전기 방사 나노섬유 스캐폴드가 태반 줄기세포가 연골세포로 분화하는 것을 촉진한다. 전기 방사 나노섬유 스캐폴드 등의 나노섬유 스캐폴드를 제조하는 방법은 공지 기술이다. Xu 외, *Tissue Engineering* 10(7):1160~1168(2004), Xu 외, *Biomaterials* 25:877~886(2004), Meng 외, *J. Biomaterials Sci., Polymer Edition* 18(1):81~94(2007)을 보라.
- <218> 앞서 열거한 조성물은 다공성을 조절할 수 있는 나노미터 규모 섬유 메시지를 갖춘 부직 매트로 전기 방사할 수 있다. 전기 방사법에서는 고압을 써서 하전된 고분자 용액의 제트류를 생성하는데, 이 제트류가 마르거나 굳어서 고분자 섬유를 남기게 된다. 한 전극은 튜브 또는 주사 바늘 등의 모세관 속에 담긴 이 고분자 용액 속에 놓으며, 다른 전극은 수집기에 붙어 있다. 전기장을 상기 튜브나 모세관의 끝에 걸어 상기 액체 표면에 전하를 유도한다. 전하끼리의 반발력 때문에 상기 용액의 표면장력과 정 반대 방향으로 힘이 생긴다. 이 전기장의 세기가 커질수록, 이 정전기적 반발력이 표면장력을 이기게 되어 하전된 제트류가 튜브나 모세관의 끝을 통하여 용액으로부터 뿜어나오게 된다. 내뿜어진 고분자 용액 제트류의 용매가 증발하여 그 자리에 하전된 고분자 섬유를 남기는데, 이는 집지된 수집용 금속 스크린에 무작위적으로 달라붙는다. 이 매트와 그 매트 속 섬유의 두께는 튜브와 수집용 스크린 사이의 거리를 늘리고 줄임으로서 조절할 수 있는데, 거리를 늘리면 일반적으로 미세한 섬유와 덜 치밀한 매트를 얻으며, kV 단위인 전압을 늘리거나 줄여 조절할 수 있는데, 전압을 늘리면 일반적으로 섬유 두께가 줄고, 유속을 늘리거나 줄여 조절할 수 있는데, 유속을 늘리면 일반적으로 섬유가 굵어지며, 고분자 용액 농도를 높이거나 낮추어 조절할 수 있는데, 고분자 농도를 높이면 일반적으로 섬유 두께가 늘어난다. 튜브 끝의 두께도 바꿀 수 있다. 어떠한 실시 태양들에서는 나노미터 규모 부직 섬유 메시나 매트 를 전기 방사로 만드는데 적절한 모든 고분자, 예를 들어 PLLA나 PLGA 등 본 명세서에서 개시하는 모든 고분자를 약 5 kV, 10 kV, 15 kV, 20 kV, 25 kV, 30 kV, 35 kV 또는 약 40 kV의 전압에서 전기 방사할 수 있다. 또한 바늘 거리(needle distance)도 바늘 끝(tip)과 수집용 스크린 사이의 거리를 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 또는 약 50 cm로 다양하게 할 수 있다. 바늘의 게이지값도 예를 들어 약 8G부터 약 24G, 예를 들어 12G 또는 22G로 다양하게 할 수 있다. 유속은 예를 들어, 약 0.01부터 약 1.0 mL/분으로, 예를 들어 약 0.05 내지 약 0.1 mL/분으로 할 수 있다. 상기 모든 고분자를 사용할 수 있는 고분자 용액 농도는 약 5% 내지 약 50% w/w 범위, 예를 들어 약 10% 내지 약 25% w/w에 있을 수 있다. 특정한 실시 태양들에서는 12G 바늘이나 22G 바늘을 써서 바늘 끝과 수집용 스크린 사이의 거리를 30 cm로 하고 유속을 약 0.05 mL/분 내지 약 0.1 mL/분으로 하여 PLLA나 PLGA 용액 약 10% 내지 약 25% w/w를 전기 방사하면 평균 지름이 약 250 nm 내지 약 10 μ m인 섬유를 포함하는 전기 방사 매트를 생산할 수 있다.
- <219> 본 발명의 태반 줄기세포는 생리적으로 허용되는 세라믹 소재에 파종하거나 접촉시킬 수 있는데, 이러한 세라믹 소재에는 인산모노-, 인산디-, 인산트리-, 인산알파트리-, 인산베타트리- 와 인산테트라칼슘, 수산화인회석, 불

소인회석, 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(등록상표), RHAKOSS(상표) 및 CORTOSS(미국 펜실베이니아주 Malvern의 Orthovita의 등록상표)와 같은 광물화 콜라겐 뼈 이식 제품들이 포함된다. 이러한 구조는 천연 및/또는 합성 재료의 혼합물, 블렌드 또는 복합물일 수 있다.

<220> 다른 실시 태양에서 태반 줄기세포 또는 이 태반 줄기세포로부터 분화된 간세포 및/또는 간 형성성 세포는 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.

<221> 다른 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포 또는 이 태반 줄기세포로부터 분화된 간세포, 간 형성성 세포, 연골 세포 및/또는 연골세포성 세포를 복합 구조일 수 있는 포말 스캐폴드(foam scaffold)에 파종할 수 있다. 이러한 포말 스캐폴드는 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 0.1 M 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 부가가 있으며, 상기 물질은 젤라틴, 알긴산염, 한천, 아가로스와 식물 검 등이 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

<222> 몇몇 실시 태양에서는 이 3차원 스캐폴드를 혈전 형성을 방지하는 물질로 처리하거나, 이 3차원 스캐폴드가 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 스캐폴드는 또한 헤파린과 같은 항혈전 형성제를 함유할 수 있다. 태반 줄기세포의 파종 전에 상기 스캐폴드를 처리하여 표면 전하를 변화(예를 들어 혈장으로 피복)시킬 수 있다.

<223> 따라서 본 명세서의 다른 측면에서는 분리된 부착성 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기세포와 전기 방사 나노섬유 스캐폴드를 함유하는 조성물을 제공한다. 한 구체적인 태양에서는 이 나노섬유 스캐폴드가 폴리(L-락트산)(PLLA), 폴리락트글리콜산(poly lactic glycolic acid(PLGA)), 제I형 콜라겐, 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE), 폴리(카프롤락톤), 폴리(L-락타이드-공중합-ε-카프롤락톤)[P(LLA-CL)](예를 들어 75:25) 및/또는 폴리(3-히드록시부티르산-공중합-3-히드록시발레르산)Opoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV)와 제I형 콜라겐의 공중합체로 된 섬유를 함유한다. 다른 어떠한 태양에서는 상기 나노섬유 스캐폴드가 평균 굵기가 약 250 나노미터 내지 약 10 μm인 섬유를 포함한다. 다른 어떠한 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포가 연골 발생 세포(chondrogenic cell)나 연골세포로 분화하는 조건 하에서 상기 조성물을 접촉한다. 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 조성물을 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 부착성 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기세포에 전기 방사 나노섬유 스캐폴드를 접촉시키는 단계를 포함하며, 이 때 상기 나노섬유 스캐폴드는 PLLA 또는 PLGA를 약 20 kV에서 방사 바늘(needle)과 수 집기(collector) 거리 약 30 cm로 유속 약 0.05 mL/분 내지 약 0.1 mL/분으로 전기 방사하여 만드는데, 여기서 상기 PLLA나 PLGA는 대략 10% w/w 내지 약 20% w/w인 용액이다.

<224> **7.2 유전자 변형 태반 줄기세포**

<225> 다른 한 측면에서는 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포와 제대 줄기세포를 유전자 변형, 예를 들어 원하는 핵산이나 폴리펩티드를 생산하도록 변형하거나, 원하는 핵산이나 폴리펩티드를 생산하는 분화된 세포, 예를 들어 간세포, 간 형성성 세포, 연골세포 및/또는 연골세포성 세포로 유전자 변형할 수 있다. 유전자 변형은 예를 들어 다음을 비롯한 바이러스 기반 벡터를 이용하여 할 수 있지만 이들에 한정되는 것은 아니다: 파필로마 바이러스 벡터, SV40 벡터, 아데노바이러스 벡터 등의 비통합성(non-integrating) 복제 벡터; 역전사바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 관련 바이러스(adeno-associated virus) 벡터 또는 복제 결함 바이러스 벡터. DNA를 세포에 도입하는 다른 방법에는 리포솜, 전기 천공(electroporation), 입자 건(particle gun), 직접 DNA 주사 등이

포함된다.

- <226> 일례로 줄기세포를 하나 이상의 적절한 발현 조절 요소(control element)에 의하여 통제되거나, 작동 연관된 DNA로 형질 전환하거나 유전자 이입(transfection)할 수 있는데, 예를 들어 이러한 조절 요소는 프로모터나 인핸서(enhancer) 서열, 전사 종료자(terminator), 폴리아데닐화 자리, 내부 리보솜 도입(entry) 자리가 있다. 이러한 DNA는 선택용 표지(selectable marker)를 갖추고 있는 것이 바람직하다. 외래 DNA의 도입 후, 조작된 줄기세포를 예를 들어 영양 강화 배지(enriched medium) 속에서 키웠다가 선택성 배지로 바꿀 수 있다. 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 조작하기 위한 DNA가 원하는 폴리펩티드, 예를 들어 사이토킨, 성장 인자, 분화 제제(differentiation agent) 또는 치료용 폴리펩티드 등의 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖추고 있다.
- <227> 줄기세포를 조작하는데 쓰이는 이 DNA는 사람 세포 등의 포유동물 세포에서 핵산 서열의 발현을 구동하는데 이 분야에 알려진 모든 프로모터를 쓸 수 있다. 예를 들어 프로모터에는 CMV 프로모터/인핸서, SV40 프로모터, 파필로마 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 프로모터, 엘라스틴 유전자 프로모터 등이 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 한 특정 태양에서는 이 프로모터를 조절할 수 있어서 원하는 때에만 해당 뉴클레오티드 서열을 발현한다. 프로모터는 유도성(예를 들어 금속티오네인(metallothionein)과 열 충격 단백질에 관련된 것들)이거나 구성적(constitutive) 프로모터일 수 있다.
- <228> 다른 특정 실시 태양에서는 이 프로모터가 조직 특이적이거나 조직 특이성을 나타낸다. 이러한 프로모터의 예에는 미엘린 염기성 단백질(myelin basic protein) 유전자 조절 부위(Readhead 외, 1987, *Cell* 48:703)(희소돌기 아교세포); 엘라스틴 I 유전자 조절 부위(Swit 외, 1984, *Cell* 38:639; Ornitz 외, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425)(이자 외분비 세포(cinar cells)); 인슐린 유전자 조절 부위(Hanahan, 1985, *Nature* 315:115)(이자 베타 세포); 미오신 경쇄-2 유전자 조절 부위(Shani, 1985, *Nature* 314:283)(골격근)가 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- <229> 본 발명의 세포를 조작하여 하나 이상의 유전자 발현을 "주입(knock in)"하거나 "결손(knock out)"할 수 있다. 세포에 자연적으로 존재하는 유전자의 발현을 저감할 수 있는데, 예를 들어 상동성 재조합 등의 방법으로 유전자를 완벽하게 불활성화함으로써 발현을 억제할 수 있다. 한 예로 어떤 실시 태양에서는 해당 단백질의 중요부를 암호화하는 엑손이나 그 부위에 5' 방향인 엑손을 네오(neo) 등의 적극적 선택용 표지(positive selectable marker)로 중단시켜 해당 표적 유전자로부터 정상적인 mRNA 생산을 막아 그 유전자를 불활성화한다. 유전자는 유전자 전체를 또는 그 일부를 결실(deletion)시켜 불활성화할 수도 있다. 해당 표적 유전자에 대하여 상동성이 있고 유전체 상으로는 서로 멀리 떨어져 있는 두 유전자 부위를 갖춘 유전자 구성체(construct)를 이용하여, 이 두 부위 사이의 서열을 결실시킬 수 있다(Mombaerts 외, 1991, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3084). 표적 유전자 발현을 억제하는 안티센스, 디엔에이아임(DNAzyme), 소형 저해 RNA(small interfering RNA)와 리보자임 분자들도 상기 줄기세포 속의 표적 유전자 활성을 낮추는데 사용할 수 있다. 예를 들어 주조직 적합성 유전자 복합체(HLA)의 발현을 억제하는 안티센스 RNA 분자는 면역 반응과 관련하여 가장 쓸모가 많다고 입증된 바 있다. 3중 나선 분자를 사용하여 표적 유전자 활성을 낮출 수 있다. 예를 들어 L. G. Davis 외(편집인), 1994, *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 2판, 미국 코네티컷주 Norwalk의 Appleton & Lange 판을 보라. 이 책의 내용은 인용에 의하여 본 명세서에 포함된다.
- <230> 한 실시 태양에서는 본 발명의 태반 또는 체대 줄기세포를 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖추고 있는 핵산 분자로 유전자 변형할 수 있는데, 여기서 이 원하는 폴리펩티드의 발현은 외래 요소(exogenous factor), 예를 들어 폴리펩티드, 소형 유기 분자 등을 써서 조절할 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 치료용 폴리펩티드일 수 있다. 더 구체적인 태양에서는 이 원하는 폴리펩티드가 IL-12나 인터류킨-1 수용체 길항제(IL-1Ra)이다. 다른 더 구체적인 태양에서는 이 원하는 폴리펩티드가 인터류킨-1 수용체 길항제와 2수소화엽산 환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR)의 융합 단백질이고 상기 외래 요소가 항엽산제, 예를 들어 메토타렉세이트이다. 이러한 유전자 구성체는 메토타렉세이트에 접촉하였을 때 IL-1Ra나 IL-1Ra와 DHFR의 융합 단백질을 발현하는 태반 또는 체대 줄기세포를 유전자 조작하는데 유용하다. 이러한 유전자 구성체는 예를 들어 류마티스 관절염의 치료에 쓸 수 있다. 이 실시 태양에서는 메토타렉세이트 등의 항엽산제에 노출되었을 때 IL-1Ra와 DHFR의 융합 단백질이 유전 해독 과정에서 상향 조절된다. 그러므로 다른 특정 태양에서는 태반 줄기세포나 체대 줄기세포를 유전자 조작하는데 쓸 핵산이 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖추고 있는데, 여기서 이 제1과 제2 폴리펩티드는 외래 인자의 존재 하에서 유전 해독이 상향 조절되는 하나의 융합 단백질로 발현한다. 이 폴리펩티드는 일과성으로 발현되거나 장기적으로(예를 들어 몇 주

나 몇 달에 걸쳐) 발현된다.

<231> 이러한 핵산 분자는 유전자 조작된 줄기세포를 적극 선택할 수 있게 하거나 조작된 줄기세포를 시각화하게 해 주는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 더 갖추고 있을 수 있다. 또 하나의 더 구체적인 태양에서는 이 뉴클레오티드 서열이 예를 들어 적절한 시각화 조건에서 형광을 내는 폴리펩티드를 암호화하는데, 예를 들어 루시페라제(Luc)이다. 더 구체적인 태양에서는 이러한 핵산 분자가 IL-1Ra-IRES-Luc을 포함하는데, 여기서 IL-1Ra는 인터류킨-1 수용체 길항제이고, IRES는 내부 리보솜 도입 자리(internal ribosome entry site)이고 DHFR은 2수소화엽산 환원효소이다.

<232> **7.3 무한증식화된 태반 줄기세포주**

<233> 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.

<234> 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.

<235> 한 실시 태양에서 이 벡터는 선별용 표지, 예를 들어 약물 내성을 부여하는 단백질을 암호화하는 유전자를 더 포함한다. 세균 네오마이신 내성 유전자(neo^R)는 쓰일 수 있는 표지의 한 예이다. neo^R을 가진 세포는 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 G418을 성장 배지에 추가하는 것과 같이 당업자에게 잘 알려진 수단을 써서 선별할 수 있다.

<236> 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.

<237> 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.

<238> 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.

<239> 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 공급하고 계대해 줄 수 있다.

<240> 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 µg/mL 테트라사이클린을 4-5일 동안 처리하면 분화를 일으키기에 충분하다. 더 분화를 일으키려면 성장 배지에 추가적인 성분을 넣을 수 있다.

<241> **7.4 분석 방법**

<242> 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포 또는 간세포 및/또는 간 형성성 세포는 배양 조건, 환경 요인, 분자(예를 들어 생분자, 소형 무기 분자 등) 등이 이러한 세포들의 증식, 증폭 및/또는 분화에 미치는 영향을 이러한 조건에 처하지 않은 세포와 비교하여 분석하는데 쓰일 수 있다.

<243> 한 실시 태양에서는 본 명세서에서 기술하는 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 어느 분자와 접촉시켜 증식, 증폭 또는 세포 분화의 변화를 분석한다. 본 명세서의 한 실시 태양에서는 예를 들어, 태반 줄기세포에서 분화한 복수의 간세포 및/또는 간 형성성 세포의 증식을 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포를 증식을 허용하는 조건 하에서 상기 화합물에 접촉시키는 단계를 포함하며, 이때 상기 세포 증식에 상기 화합물과 접촉하지 못한 세포의 경우와 비교하여 검출 가능한 변화가 일어나면 상기 화합물은 간세포 및/또는 간 형성성 세포의 증식을 조절하는 화합물로 동정하게 된다. 어느 구체적인 태양에서, 상기 화합물은 증식 억제제로 동정된다. 다른 구체적 태양에서 상기 화합물은 증식 향상제로 동정된다.

<244> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포에서 분화한 복수의 간세포 및/또는 간 형성성 세포의 세포 증폭(expansion)을 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 증폭을 허용하는 조건 하에서 상기 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 상기 화합물에 접촉시키는 단계를 포함하며, 이 때 상기 간세포 및/또는 간 형성성 세포 증폭에 상기 화합물과 접촉하지 못한 복수의 간세포 및/또는 간 형성성 세포의 경우와 비교하여 검출 가능한 변화가 일어나면 상기 화합물은 간세포 및/또는 간 형성성 세포의 증폭을 조절하는 화합물로 동정하게 된다. 어느 구체적인 태양에서, 상기 화합물은 증폭 억제제로 동정된다. 다른 구체적 태양에서 상기 화합물은 증폭 향상제로 동정된다.

<245> 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포의 세포 분화, 예를 들어 간세포 및/또는 간 형성성 세포로의 분화를 조절하는 화합물을 확인하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 간세포 및/또는 간 형성성 세포로의 분화를 허용하는 조건 하에서 상기 줄기세포를 상기 화합물에 접촉시키는 단계를 포함하며, 이 때 상기 줄기세포 분화에 상기 화합물과 접촉하지 못한 줄기세포의 경우와 비교하여 검출 가능한 변화가 일어나면 상기 화합물은 태반 줄기세포의 분화를 조절하는 화합물로 동정하게 된다. 어느 구체적인 태양에서, 상기 화합물은 분화 억제제로 동정된다. 다른 구체적 태양에서 상기 화합물은 분화 향상제로 동정된다.

<246> **7.5 태반 줄기세포 은행**

<247> 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 10⁷로 배증시켜 세포군을 제조하게 된다. 룯들은 한 태반 조직으로부터 유래하는 것이 바람직하지만, 복수의 태반 조직으로부터 유래할 수도 있다.

<248> 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 재현탁되는데 이를 제0 계대(Passage 0) 세포라고 정의한다.

<249> 제0 계대 세포는 증폭 배양물(expansion culture)을 파종(seed)하는데 쓰인다. 증폭 배양물은 별개의 세포 배양 장치, 예를 들어 NUNC(상표)의 Cell Factory의 모든 배열일 수 있다. 제0 계대 배양물 속의 세포는 증폭 배

양물을 과증하기 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 과증할 수 있다. 바람직하게는 약 2×10^4 내지 약 3×10^4 개의 제0 계대 세포를 이용하여 증폭 배양물을 과증한다. 증폭 배양물의 수는 제0 계대 세포의 수에 달려 있는데, 이 수의 다소는 상기 줄기세포를 얻은 특정 태반(들)에 달려 있다.

<250> 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.

<251> 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.

<252> 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 과증하는데 쓰이는데, 2차 세포 은행의 세포들은 약 8차례 더 배증하게끔 증폭된다. 이 단계의 세포를 수집하고 냉동한 다음 이를 이용하여 새로운 증폭 배양물을 과증하는데, 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.

<253> 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 과기한다. 이러한 검사는 태반 줄기세포 릫의 제조 도중 어느 때이건 할 수 있고, 예를 들어 제0 계대 세포의 수립 이후 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.

<254> 상기 세포 은행의 한 변형에서는 세포 은행의 태반 줄기세포, 예를 들어 하나의 태반이나 여러 태반들로부터 유래한 태반 줄기세포의 전부 또는 다수를 간세포 및/또는 간 형성성 세포로의 분화를 일으키는 조건에 노출시킨다. 이러한 세포는 하나 이상의 간세포 표지로서 태반 줄기세포에서는 존재하지 않거나 검출 가능한 차이의 양으로 존재하는 표지의 발현을 토대로 선별할 수 있다. 이러한 실시 태양에서는 세포 은행이 간세포 및/또는 간 형성성 세포 단독을 포함하거나 이들 세포와 간세포 또는 간 형성성 세포로 분화하지 않은 태반 줄기세포를 함께 포함할 수 있다.

<255> **7.6 간 질환의 치료**

<256> 본 명세서의 다른 측면에서는 간 기능 이상과 관련된 질병, 장애나 상태를 지니는 대상인을 치료하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 대상에게 본 명세서에서 기술하는 방법에 따라 태반 줄기세포를 분화하여 얻은 간세포나 간세포군을 도입하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서 이 질병, 장애나 상태는 간경화이다. 몇몇 실시 태양에서 이 질병, 장애나 상태는 간 독성인데, 예를 들어 알코올 또는 버섯 독소 등의 독소 섭취로 일어난 것이다. 몇몇 실시 태양에서 이 질병, 장애나 상태는 바이러스 감염, 예를 들어 A, B, C, D 또는 E형 간염의 감염이다.

<257> 간 기능 이상과 관련된 질병이 있는 사람, 예를 들어 간 경화 진단을 받은 사람은 그 질병의 진행 중 어느 시점에서라도 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. 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 100억개, 바람직하게는 1000만개와 10억개 사이, 또는 태반 줄기세포 5천만개와 1억개 사이 범위에 포함될 수 있다.

<258> 이러한 투여는 정맥 투여가 바람직하지만 살아있는 세포를 투여하는데 있어서 종래 기술에서 인정받은 어떠한 경로를 사용하여도 좋다. 태반 줄기세포, 예를 들어 간세포 특성을 하나 이상 나타내는 세포로 분화한 태반 줄기세포를 간의 하나 이상의 부위에 곧바로 이식, 예를 들어 완충 용액이나 배지 용액에 담아 이식할 수 있다. 한 실시 태양에서는 세포 은행에서 구한 태반 줄기세포를 사용한다.

<259> 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포가 간세포 또는 간 형성성 세포로 분화하는 것을 촉진하는 하나 이상의 제제에 이 복수의 태반 줄기세포를 접촉시킨다. 이러한 복수의 세포 중 일부는 미분화 태반 줄기세포(즉 간세포로 분화를 시작하지 않은 태반 줄기세포)이고, 일부는 간세포의 특성을 하나 이상 발현하기 시작한 태반 줄기세포이고, 일부는 분화 완료한 간세포의 특성 모두, 대부분 혹은 다수를 나타내기 시작한 태반 줄기세포일 수 있다.

<260> **7.7 태반 줄기세포 유래 간세포를 이용하여 항바이러스제를 확인하는 용도**

<261> 본 명세서에서 기술하는 간세포와 간세포 배양은 어느 화합물이 항바이러스제인지를 결정하는 생체내 또는 시험관내 분석에 쓰일 수 있다.

<262> **시험관내 분석.** 한 실시 태양에서는 복수(예를 들어 세포군)의 태반 줄기세포를 이용하여 다음과 같이 항바이러스제를 찾아낼 수 있다. 본 명세서의 다른 부분에 기재한 대로 태반 줄기세포군을 수립한다. 이 태반 줄기세포군을 상기 태반 줄기세포가 간세포로 분화하는 촉진하는 하나 이상의 화합물이나 제제에 접촉시킨다. 이어서 이 태반 줄기세포를 적어도 복수의 상기 태반 줄기세포가 간세포의 특징적 표지를 하나 이상 발현할 때까지, 혹은 예를 들어 사이토케라틴 18의 경우는 간세포에 특징적인 수준까지 발현할 때까지 배양한다.

<263> 태반 유래 간세포 또는 간 형성성 세포를 이어서 바이러스로 감염시킨다. 이 바이러스는 간 조직을 특이적으로 감염하는 바이러스, 예를 들어 A, B, C, D 또는 E형 간염 바이러스인 것이 바람직하다. 저장용 바이러스(stock virus)는 해당 바이러스에 감염되어 혈청 속에 바이러스를 검출 가능한 양으로 가지고 있는 한 명 이상의 사람으로부터 얻은 혈청에서 취할 수 있다. 바이러스를 감염된 동물, 예를 들어 감염된 설치류, 토끼 등에서 얻거나 상업적인 바이러스원 또는 바이러스에 감염된 세포주로부터 얻을 수도 있다.

<264> 그 바이러스원이 무엇이건 간에, 이 바이러스를 태반 유래 간세포 또는 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 함유하는 태반 줄기세포군에 접촉시킨 다음, 감염하는데 충분한 시간 동안 놓아둔다. 이 간세포 또는 태반 줄기세포군은 감염시에 예를 들어 조직 배양 접시나 플라스크에서 대략 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 세포 합류에 이르렀거나, 적어도 그 정도 합류에 이르렀거나, 합류 정도가 그 이하이다. 여러 실시 태양에서는 태반 줄기세포에서 분화한 이 간세포 또는 간 형성성 세포, 또는 간세포 또는 간 형성성 세포의 세포군을 바이러스, 예를 들어 간 친화성(hepatotropic) 바이러스에 감염시키는데, 예를 들어 바이러스 입자 약 1×10^8 내지 1×10^9 개에 감염시킨다.

<265> 한 특정 실시 태양에서는 태반 유래 간세포 또는 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 함유하는 태반 줄기세포군을 세포 배양 후에 트립신 처리와 원심분리하고 세척한 다음 배지 속에 현탁하여 수집한다. 세포 분량을 12웰 플레이트의 커버슬립에 놓고, 2% 디메틸설폭사이드(DMSO)로 처리하는데, 선택적으로는 6~10일 할 수 있다. 이어서 세포를 바이러스 입자, 예를 들어 감염된 혈청과 함께 37°C에서 10~20 시간 동안 배양한다. 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포 간세포 또는 간세포 및/또는 간 형성성 세포를 함유하는 태반 줄기세포군을 바이러스 감염 세포주와의 공동 배양을 통하여 감염시키는데, 예를 들어 HBV에 감염된 간암 세포주 HB611(Ochiya 외, "An *In Vitro* System for Infection with Hepatitis B Virus That Uses Primary Human Fetal Hepatocytes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:1875-1879 (1989)을 보라)이 있다.

<266> 감염 후 2-5일째에 이 세포들을 수집하고, 존재하는 바이러스 양을 측정한다. 바이러스 양은 바이러스 항원을 인식하는 하나 이상의 항체를 이용하여 측정할 수 있는데, 예를 들어, A형 간염 바이러스 표면 항원(AbD Serotec에서 항체 구입 가능), B형 간염 바이러스 HBeAg의 HBsAg, C형 간염 바이러스 내핵(core) 항원, D형 간염 내핵 항원, E형 간염 내핵 항원을 쓸 수 있다. 다른 실시 태양에서는 감염 세포 속 바이러스 양을 정량적 또는 반정량적 PCR로 측정한다. 한 특정 실시 태양에서는 그에 쓰이는 프라이머가 바이러스의 한 복제 형태, 예를 들어 HBV의 공유 결합 폐쇄된 원형(cccHBV)을 검출하거나 이에 대하여 특이성이 있다. 다른 특정 실시 태

양에서는 쓰이는 프라이머가 cccHBV와 HBV의 완화된 원형을 모두 증폭할 수 있다.

- <267> 화합물이나 제제의 시험은 앞서 개략적으로 설명한 과정의 여러 지점에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 이 화합물을 본 명세서에서 제공하는 간세포 또는 간 형성성 세포에 대하여, 배양물로부터 수집할 때, 원심분리 후이지만 바이러스와 접촉 전에, 바이러스 접촉과 같은 때에(예를 들어 동시에 혹은 몇 분 안에) 혹은 바이러스와 접촉 후에 접촉시킬 수 있다. 예를 들어 한 실시 태양에서는 감염 초기에 이 화합물이 가지는 영향을 측정하기 위하여 이 화합물과 본 명세서에서 제공하는 간세포 또는 간 형성성 세포를 바이러스 감염 전에 접촉시킬 수 있다. 다른 실시 태양에서는 예를 들어 이 화합물에 접촉시키지 않은 세포와 비교하였을 때 이 화합물이 바이러스 제조에 영향을 미치는지 측정하기 위하여 이 화합물과 본 명세서에서 제공하는 감염된 간세포 또는 간 형성성 세포를 감염 후 약 1일 내지 약 5일에 접촉시킬 수 있다. 다른 실시 태양에서는 관심 대상인 화합물이 감염되지 않은 세포의 감염에 영향이 조금이라도 있는지 측정하기 위하여 감염 세포를 이 화합물과 접촉시키고 본 명세서에서 제공하는 미감염된 간세포 또는 간 형성성 세포와 공동 배양할 수 있다.
- <268> 한 특정 실시 태양에서는 이 화합물과 접촉하지 않은 간세포 또는 간 형성성 세포와 비교하였을 때, 이 화합물이 어느 시점에서라도, 예를 들어 이 화합물과의 접촉 후 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 내에, 본 명세서에서 제공하는 감염된 간세포 또는 간 형성성 세포에서 제조되는 바이러스의 양이 검출 가능하게 줄어들게 한다면 그 화합물은 항바이러스 화합물이다. 다른 실시 태양에서는 이 화합물의 부재하에 감염된 간세포와 미감염 간세포를 공동 배양한 경우와 비교하였을 때, 이 화합물이 이 화합물의 존재 하에 공동 배양시 감염된 간세포의 수를 검출 가능하게 줄어들게 한다면 그 화합물은 항바이러스 화합물이다.
- <269> *생체내 분석.* 태반 줄기세포에서 분화된 간세포 또는 간 형성성 세포는 항바이러스성 화합물을 찾아내는 생체내 분석의 일부분으로 쓸 수 있다. 이 분석에서는 간세포 또는 간 형성성 세포를 바이러스, 예를 들어 B형 간염 바이러스에 감염시키고 특정한 마우스 숙주에 이식하여 그 마우스에 바이러스 혈증을 일으킨다. 이어서 화합물을 이 마우스에 투여하고 이 화합물이 혈중 바이러스량이나 바이러스 복제에 미치는 영향을 측정한다. 이러한 분석은 실시예 10에서 상술한다.
- <270> 한 실시 태양에서는 상기 분석에서 숙주로서 치사량의 감마선 조사를 받았지만 면역 억제(immune-restricted) 마우스, 예를 들어 NOD/SCID 마우스로부터 골수를 투여받아 보호된 정상 마우스를 사용한다. 이 마우스에 골수를 투여하는 것과 동시에, 또는 골수 투여 6~7일 후 이내에 복수의 감염된 태반 줄기세포 유래 간세포 또는 간 형성성 세포를 상기 숙주 마우스에 투여하는데, 예를 들어 복강내, 신장 섬유 피막 속으로(under the kidney capsule), 숙주 마우스 간 속으로, 귓바퀴 속으로 투여한다. 이식 후 6~20일 내에 관심 대상 화합물을 이 마우스에 투여한다. 이러한 투여는 의학계에서 허용하는 모든 방식으로 할 수 있지만, 바람직하게는 복강내 또는 국부 투여를 이용한다.
- <271> 이 숙주 마우스의 평가, 예를 들어 혈청내 바이러스량 또는 바이러스 존재의 다른 지표 또는 복제에 대한 평가는 화합물 투여 후 아무 때라도 할 수 있다. 여러 실시 태양에서는 이 마우스의 조직에 대하여 바이러스 입자, 예를 들어 바이러스의 복제 형태에 있어서 그 존부를 평가한다. 앞서와 같이, 바이러스량은 예를 들어 바이러스 항원을 인식하는 하나 이상의 항체를 이용하여 측정할 수 있는데, 예를 들어, A형 간염 바이러스 표면 항원 (AbD Serotec에서 항체 구입 가능), B형 간염 바이러스 HBeAg의 HBsAg, C형 간염 바이러스 내핵(core) 항원, D형 간염 내핵 항원 또는 E형 간염 내핵 항원을 쓸 수 있다. 다른 실시 태양에서는 예를 들어 숙주 마우스 혈청 시료 속 B형 간염 바이러스의 존재를 B형 간염 바이러스 외피(viral envelope) 단백질, 표면 항원 또는 내핵 항원에 대한 하나 이상의 항체를 사용하여 검출한다. 다른 실시 태양에서는 감염된 세포 속 바이러스의 양을 정량적 또는 반정량적 PCR로 측정한다. 특정 실시 태양에서는 그에 쓰이는 프라이머가 바이러스의 한 복제 형태, 예를 들어 HBV의 공유 결합 폐쇄된 원형(cccHBV)을 검출하거나 이에 대하여 특이성이 있다. 다른 특정 실시 태양에서는 쓰이는 프라이머가 cccHBV와 HBV의 완화된 원형을 모두 증폭할 수 있다.

7.8 연골 손상의 치료

- <272>
- <273> 다른 실시 태양에서는 분리된 태반 줄기세포, 분리된 태반 줄기세포군 및/또는 그로부터 분화된 연골세포성 세포나 연골세포는 연골 조직을 비롯한 자기 유래 또는 동종간(allogeneic) 조직 재생 또는 대체 요법이나 과정에 쓰일 수 있는데, 연골 조직에 그치는 것은 아니다. 어떤 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 이용하여 연골 외상(예를 들어 연골의 끊어짐, 찢어짐 등)을 비롯한 연골 관련 질병, 장애 또는 상태를 치유하거나 복구할 수 있다. 더 구체적인 실시 태양에서는 이 연골이 관절 연골이다. 태반 줄기세포는 연골에 직접, 예를 들어 세포 현탁액 형태로 투여하거나 연골에 매트릭스와 함께 투여할 수 있는데, 예를 들어 앞서 7.1.4에서 설명한 전기 방사 나노섬유 스캐폴드와 같은 전기 방사 나노섬유 스캐폴드 매트릭스를 쓸 수 있다. 스캐폴드 없이 또는 그

와 함께 연골에 접촉하는 태반 줄기세포는 CD200⁺, CD105⁺, CD90⁺, CD34⁻, CD45⁻ 태반 줄기세포인 것이 바람직하지만 본 명세서에서 기술하는 어떠한 태반 줄기세포이어도 좋다. 연골의 질병, 장애 또는 상태를 치료하는데 쓰일 태반 줄기세포 전부 또는 그 중 다수는 연골에 투여 전에 연골세포성 세포로 분화하거나 아니면 미분화 상태로 투여할 수 있다. 이 연골세포성 세포나 연골세포들은 단독으로, 또는 태반 줄기세포 및/또는 다른 유형의 줄기세포에 함께 세포 현탁액으로 투여하거나, 혹은 매트릭스 예를 들어, 전기 방사 나노섬유 스캐폴드와 함께 연골에 투여할 수 있다.

<274> 특정 태반 줄기세포군 단독, 또는 스캐폴드, 예를 들어 전기 방사 나노섬유 스캐폴드와 특정 태반 줄기세포의 조합이 가지는 효과는 연골 부상을 자발 치유하지 못하는 동물 모형에서 평가할 수 있는데, 예를 들어 아래 실시예 14에서 기술하는 토끼 뼈연골 결함 모형이 있다.

<275> **7.9 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포의 용도**

<276> 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포와 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 농축된 세포군은 조혈 줄기세포가 필요한 개인, 예를 들어 화학 요법이나 골수 절제(myeloablation) 후 조혈 기능 재구성이 필요한 개인의 치료하는데 쓸 수 있다. 한 실시 태양에서는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 단독으로 이러한 개인의 치료에 쓰인다. 다른 실시 태양에서는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 두번째 유형의 줄기세포 또는 제2의 줄기세포군과 함께 사용하거나 이를 보충하는데 사용한다. 이러한 제2 세포군 속의 줄기세포는 조혈 줄기세포, 비조혈 줄기세포 또는 양쪽 모두를 포함할 수 있다. 한 실시 태양에서는 상기 제2 줄기세포군이 제대혈 속 줄기세포를 포함한다. 다른 실시 태양에서는 제2 줄기세포군이 골수 속 줄기세포를 포함한다. 다른 특정 태양에서는 이 줄기세포를 상기 개인에게 이식한다.

<277> 예를 들어 골수 이식과 같은 줄기세포 주입을 받는 환자는 한 단위의 유핵세포를 받는 것이 전형적인데, 여기서 한 단위는 대략 1×10^9 유핵세포($1 \sim 2 \times 10^6$ CD34⁺ 줄기세포에 해당)이다. 따라서 한 실시 태양에서는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 함유하는 유핵세포를 한 개체에 투여할 때 그 수는 골수 대체 이식에 정상적으로 투여하는 세포 수의 적어도 다섯 배 이상이다. 본 방법의 다른 특정 실시 태양에서는 한 개체에 투여하는 유핵세포의 수가 골수 대체 이식에 정상적으로 투여하는 세포 수의 적어도 열 배 이상이다. 다른 특정 실시 태양에서는 한 개체에 투여하는 유핵세포의 수가 골수 대체 이식에 정상적으로 투여하는 세포 수의 적어도 열다섯 배 이상이다. 본 방법의 다른 실시 태양에서는 한 개체에 투여하는, CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 포함하는 유핵세포의 총수는 체중 매 kg마다 $1 \sim 1000 \times 10^8$ 이다.

<278> 다른 실시 태양에서, CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포, 예를 들어 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 농축된 세포군은 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 농축된 조혈 줄기세포군을 이식받지 못한 경우의 세포 생착(engraftment)과 비교하였을 때, 조혈 줄기세포 등의 줄기세포가 필요한 개체에서의 세포 생착을 향상시킨다. 여러 태양에서, 세포 생착은 이식 후 적어도 제 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일 동안 혹은 그 동안 만큼 향상된다. 다른 더 구체적인 태양에서, 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포는 세포가 필요한 개체 내에서 세포 생착을 적어도 이식 후 21일 동안 혹은 그만큼 동안 향상시킨다. 특정 실시 태양에서는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 세포가 필요한 개체 내에서 세포 생착을 적어도 이식 후 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55주 또는 1년 이상 동안 혹은 그만큼 동안 향상시킨다.

<279> CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포의 이러한 줄기세포를 함유하는 줄기세포군은 개체에 쉽게 투여할 수 있는 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어, 이 세포와 세포군은 의약 용도에 적절한 용기 속에 포함될 수 있다. 이러한 용기는 예를 들어, 멸균 플라스틱 백, 플라스크, 단지 또는 상기 통합 줄기세포군을 쉽게 담을 수 있는 다른 용기일 수 있다. 이 용기는 바람직하게는 통합 줄기세포군의 정맥하 투여를 용이하게 하거나 가능하게 해 주는 용기이다. 이 용기, 예를 들어 백은 태반 유래 줄기세포와 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포를 함께, 예를 들어 혼합 세포군으로 수용하거나, 상기 두 줄기세포군을 따로 수용할 수 있다. 상기 후자의 태양에서, 이 백은 서로 연결된 복수의 빈 내부 구획을 가져서 상기 태반 유래 줄기세포와 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포가 투여 전 혹은 도중에 혼합될 수 있게 하는 것이 바람직하다. 이 용기는 상기 통합 줄기세포군의 냉동보존을 지원하는 것이 바람직하다.

- <280> 따라서 본 명세서의 한 실시 태양에서는 한 용기 속에 수용된 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 농축된 세포군을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 명세서의 다른 실시 태양에서는 줄기세포군을 함유하는 조성물을 제공하는데, 여기서 이 줄기세포군은 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포와 제2 유형의 줄기세포를 용기 속에 함유한다. 한 특정 태양에서, 상기 용기는 백, 플라스크 또는 단지(jar)이다. 더 특정한 태양에서, 상기 태반 유래 줄기세포와 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포는 상기 백 속에 함께 담긴다. 다른 더 구체적인 태양에서는, 상기 태반 유래 줄기세포와 상기 제2 유형의 줄기세포가 상기 백 속에서 각각 수용된다. 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 상기 통합 줄기세포군의 냉동보존을 촉진하는 화합물을 하나 이상 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 통합 줄기세포군은 생리학적으로 허용되는 용액 속에 포함된다. 더 구체적인 태양에서, 상기 생리학적으로 허용되는 용액은 0.9% NaCl 용액이다. 다른 더 구체적인 태양에서, 상기 백은 멸균 플라스틱 백이다. 더 구체적인 태양에서, 이 백은 상기 줄기세포의 정맥하 투여를 용이하게 하거나 가능하게 해 준다. 다른 특정 태양에서, 상기 줄기세포는 상기 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포와 HLA 일치하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 줄기세포는 상기 제2 유형의 줄기세포와 적어도 부분적으로 HLA 불일치하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포는 복수의 기증자로부터 유래한 것이다.
- <281> CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포와 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 함유하는 세포군은 개체에 투여되기 전에 일정 기간 동안 배양될 수 있다. 예를 들어 한 실시 태양에서는 상기 줄기세포들을 노치(Notch) 작용제, 예를 들어 실질적으로 노치 단백질의 세포내 도메인만으로 이루어진 노치 단백질의 결실 형태나 델타 단백질을 함유하는 배지 속에서 배양할 수 있다. 미국 출원 2004/0067583호를 보라.
- <282> 다른 실시 태양에서는 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포군과 제대혈 세포군을 이들이 필요한 환자에게 차례로 투여한다. 한 태양에서는 상기 태반 줄기세포군을 먼저 투여하고, 제2 유형의 줄기세포군을 다음에 투여한다. 다른 태양에서는, 상기 제2 유형의 줄기세포군을 먼저 투여하고, 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포군을 나중에 투여한다.
- <283> CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포와 제2 유형의 줄기세포, 예를 들어 제대혈 유래 줄기 또는 전구세포나 혈액 은행에서 온 또는 냉동 보존된 제대혈을 포함하는 제대혈로 이루어진 통합 세포군은 의학적으로 허용되는 모든 수단을 이용하여 이식 전에 혼합할 수 있다. 한 실시 태양에서, 상기 두 개의 세포군은 물리적으로 혼합된다. 다른 실시 태양에서는 상기 세포군들을 상기 개체에 투여하기 직전(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10분 전)에 혼합한다. 다른 태양에서는 상기 세포군들을 상기 개체에 투여하기 5분 넘게 앞선 시점에 혼합한다. 본 발명의 다른 태양에서는 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포 및/또는 제2 유형의 줄기세포를 상기 개체에 투여하기 전에 냉동보존하고 해동한다. 다른 태양에서는 상기 줄기세포를 상기 개체에 대한 투여 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 이상 전에 혼합하는데, 여기서 상기 양 세포군들 중 어느 하나 또는 양쪽 모두는 상기 투여 전에 냉동보존되고 해동된 것이다. 다른 태양에서는 상기 줄기세포군을 한 번 이상 투여할 수 있다.
- <284> 다른 실시 태양에서 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포 및/또는 제2 유형의 줄기세포는 이식 전에 예비 조건화(preconditioning)를 거친다. 바람직한 한 태양에서, 예비 조건화는 상기 세포를 기체 투과성 용기 속에 일반적으로 얼마 동안 약 -5°C 내지 약 23°C, 약 0°C 내지 약 10°C, 바람직하게는 약 4°C 내지 약 5°C 하에서 저장하는 것을 포함한다. 이 세포들은 18시간 내지 21일, 48시간 내지 10일, 바람직하게는 3~5일 동안 저장할 수 있다. 이 세포들은 예비 조건화 전에 냉동보존하거나, 투여 직전에 예비조건화할 수 있다.
- <285> 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포 또는 제2 유형의 줄기세포 중 어느 하나 또는 양쪽 모두를 줄기세포가 필요한 개체에 접촉하기 전에 세포 분화시킬 수 있다. 예를 들어, 조혈세포 생착을 위해서 접촉하는 경우, 상기 줄기세포를 조혈세포 계통으로 분화할 수 있다. 몇몇 실시 태양에서는 줄기세포군의 이식 방법이 (a) CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포 분화를 유도하는 단계, (b) 상기 태반 줄기세포와 제2 유형의 줄기세포, 예를 들어 제대혈 줄기세포를 혼합하여 통합 줄기세포군을 형성하는 단계, (c) 상기 통합 줄기세포군을 줄기세포가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 이식 방법의 다른 태양에서는 (a) 제2 유형의 줄기세포의 분화를 유도하는 단계, (b)

상기 분화된 세포와 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 혼합하여 통합 줄기세포군을 형성하는 단계, (c) 상기 통합 줄기세포군을 줄기세포가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시 태양에서는 통합 줄기세포군 이식 방법이 (a) CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포와 제대혈 세포군을 혼합하는 단계, (b) 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포와 제대혈 세포의 혼합물의 분화를 유도하는 단계, (c) 상기 혼합물을 줄기세포가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

<286> 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포가 농축된 통합 줄기세포군은 주사, 예를 들어 정맥 주사, 근육 주사, 복강내 주사, 눈 속 주사, 특정 조직에 대한 직접 주사, 수혈 등을 포함하는 약학적 또는 의약적으로 허용된 모든 방식에 따라 환자에게 이식할 수 있다. 예를 들어, 통합 줄기세포군, 이를테면 제대혈 유래 줄기세포와 통합된 태반 줄기세포는 정맥 주입으로 이식할 수 있다. 다른 태양에서는 태반 줄기세포와 심근 줄기세포를 함유하는 현탁액 상태의 통합 줄기세포군을 심근 조직, 예를 들어 심장의 허혈 부위에 직접 주사할 수 있다. 이 통합 줄기세포군은 모든 약학적으로 허용되는 담체를 포함하거나 그 속에 현탁될 수 있다. 상기 통합 줄기세포군은 약학적으로 또는 의학적으로 허용되는 어떠한 담체, 예를 들어 혈액 백, 운반 백, 플라스틱 튜브 또는 비알을 통해서라도 담지되거나 저장되거나 운반될 수 있다.

<287> 이식 후, 사람 수용자의 세포 생착은 예를 들어, 핵산 또는 단백질 검출이나 다른 분석 방법을 통하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 중합 효소 연쇄 반응, STR, SSCP, RFLP 분석, AFLP 분석 등을 이용하여 수용자로부터 얻은 조직 시료 속의 생착 세포에 특이적인 뉴클레오티드 서열을 검출할 수 있다. 이러한 핵산 검출과 분석 방법은 공지 기술이다. 한 실시 태양에서, 세포 생착은 수용 대상의 조직 시료 속의 생착 세포에 특이적이고 실험 배경으로부터 구별할 수 있는 핵산의 존재로부터 알 수 있다. 분석할 이 조직 시료는 예를 들어 생검(예를 들어 골수 흡인물) 또는 혈액 시료일 수 있다.

<288> 한 실시 태양에서는 예를 들어 골수 절제와 같은 의료 절차의 직전에 환자로 부터 말초 혈액 시료를 채취한다. 이 절차 후, 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군을 환자에게 투여한다. 투여 후 적어도 한 차례, 말초 혈액 시료를 다시 채취한다. 상기 두 시료에 대하여 예를 들어, LabCorp(Laboratory Corporation of America)에서 입수할 수 있는 표지(알릴)에 대한 PCR 프라이머를 이용하여 STR 프로파일을 얻는다. 이식 후 표지(알릴)의 숫자 또는 특성에 차이가 있으면 이는 세포 생착이 일어났음을 나타낸다.

<289> 세포 생착은 중성구의 재출현을 검출하는 것으로도 증명할 수 있다.

<290> 다른 실시예에서, 생착 세포에 특이적인 표지는 이식된 줄기세포 또는 상기 이식된 줄기세포가 분화하리라고 예상되는 세포에 특이적인 항체를 이용하여 수용 대상의 조직 시료로부터 검출할 수 있다. 한 실시 태양에서, 태반 줄기세포와 제대혈 유래 줄기세포의 통합 세포군의 생착은 CD45⁺, CD19⁺, CD33⁺, CD7⁺ 및/또는 CD3⁺ 세포의 존재를 측정하기 위한 FACS 분석으로 평가할 수 있는데, 여기서는 통합 세포군에 적절한 항체를 가하여 결합하도록 하고, 세척하고(PBS 등으로), 세포를 고정한 다음(예를 들어 1% 파라포름알데히드), 적절한 FACS 장치(예를 들어 FACSCalibur 흐름 세포 측정 장치(Becton Dickinson사))로 분석한다. 태반 줄기세포 및/또는 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포가 수용 대상과 성별이 다른 한 개체에서 온 것일 때, 예를 들어, 남성 기증자와 여성 수용자일 때는 세포 생착을 성 특이적 표지, 예를 들어 Y 염색체 특이적 표지의 존재를 검출함으로써 살펴볼 수 있다. 한편 태반 줄기세포 및/또는 제2 세포원으로부터 얻은 줄기세포를 유전적으로 변형시켜, 대상 확인을 도울 수 있는 고유한 표지나 핵산 서열, 예를 들어 RFLP 표지, β-갈락토시다제 또는 녹색 형광 단백질 등을 발현하도록 할 수도 있다.

<291> 세포 생착 정도는 어떠한 공지 수단을 이용해서라도 평가할 수 있다. 한 태양에서, 세포 생착 정도는 다음과 같은 단계별 평가 시스템으로 평가하는데, 여기서는 이식 수용 대상으로부터 세포 고정된 항체 결합 조직의 얇은 절편을 취하여 이용한다. 이 예시 평가 시스템에서, 세포 생착은 다음과 같이 평가한다. : 0 = 생착 양성인 세포 없음(즉 생착 세포에 특이적인 항체와 결합한 세포 없음); 0.5 = 하나 또는 두 개의 양성 세포, 양성일 수는 있지만 실험 배경이나 비특이적 염색 결과와 구별하기 어려움; 1 = 2~20 개의 흩어진 양성 세포; 2 = 약 20~100 개의 흩어지거나 군집한 양성 세포가 조직 전체에 걸쳐 있음; 3 = 100 개의 이상의 양성 세포가 조직의 50% 미만을 차지함; 4 = 세포 중 50% 이상이 양성임. 한 특정 태양에서, 세포 생착은 세포 중 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20% 이상 혹은 이보다 더 많은 세포가 양성으로 염색되었는지에 따라 결정한다.

<292> 다른 태양에서, 세포 생착은 생착 세포가 수행하는 생물학적 기능을 하나 이상 얻었는지를 분석하여 결정한다. 예를 들어, 골수 절제를 받은 한 수용자가 태반 줄기세포와 제대혈 유래 줄기세포를 함유하는 통합 줄기세포군

을 이식받으면, 세포 생착 정도는 정상 조혈 기능, 혈액 세포군과 혈액 기능이 어느 정도나 정상으로 되돌아가느냐로 결정할 수 있다.

- <293> 상기 통합 줄기세포군 전체 또는 일부분이 수용 대상자와 HLA 불일치하는 경우는 기증자 세포의 면역 거부를 줄이기 위하여 수용 대상자를 치료할 필요가 있을 수 있다. 면역 거부 반응을 줄이는 방법은 예를 들어 미국 특허 제5,800,539호와 5,806,529호에 나와 있는데, 이들은 인용에 의하여 본 명세서에 포함된다.
- <294> 따라서 한 태양에서는, 조혈 줄기세포를 함유하는 통합 줄기세포군을 이용하여 림프종, 백혈병(만성 또는 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, Hodgkin씨 병 등), 골수 이형성증, 골수 이형성 증후군 등의 혈액암을 치료할 수 있다. 다른 태양에서, 상기 질병, 질환 또는 상태는 만성 육아종증이다.
- <295> 조혈 기능 재구성은 빈혈 치료에도 쓰이기 때문에, 본 명세서에서는 나아가 빈혈 또는 혈액 헤모글로빈 이상을 가지는 개체를 본 발명의 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포로 치료하는 것을 제공한다. 이러한 빈혈 또는 이상은 자연적인 것(예를 들어 유전 또는 병 때문인 것)이거나 인위적으로 생긴 것(예를 들어 의도적 혹은 우연한 중독, 화학요법 등)일 수 있다. 다른 태양에서, 상기 질병 또는 질환은 골수 기능 부진 증후군(예를 들어 무형성 빈혈, Kostmann 증후군, Diamond-Blackfan 빈혈, 무거대핵세포저혈소판증 등), 골수 이상 또는 조혈 질환 또는 이상이다. 한 특정 실시 태양에서는 상기 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 복수의 중간엽 줄기세포 및/또는 복수의 부착성 태반 줄기세포와 함께 투여할 수 있다.
- <296> 다른 실시 태양에서는 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 단독으로 또는 제2 유형의 줄기세포, 예를 들어 중간엽 줄기세포 또는 부착성 태반 줄기세포와 함께 장기 재생과 생체내 부상 복구를 위하여 손상된 장기 속에 도입한다. 이러한 손상은 심근 경색, 발작 이상, 다발성 경화증, 뇌졸중, 저혈압, 심정지, 허혈, 염증, 나이와 관련된 인식 손상, 뇌성 마비, 신경퇴행성 질환, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, Leigh 병, 에이즈 치매, 기억력 손상, 근육 위축성 측삭 경화증, 허혈 신 질환, 뇌 또는 척수 외상, 심장-폐 바이패스, 녹내장, 망막 허혈, 또는 망막 외상을 포함하는 질환 또는 상태 때문일 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.
- <297> 다른 태양에서, 상기 질병, 질환 또는 상태는 테이-삭스(Tay-Sachs), 니만-픽(Niemann-Pick), 파브리(Fabry's) 병과 같은 리소좀 축적증, 가우셔(Gaucher's) 병(예를 들어 글루코세레브로시다제 결핍증), 헌터(Hunter's) 및 헐러(Hurler's), 마로토-라미(Maroteau-Lamy), 푸코시드 축적증(fucosidosis, 푸코시다제 결핍증), 바텐(Batten) 증후군(CLN3)과 기타 갱글리오시드증(gangliosidosis), 점액다당류증(mucopolysaccharidosis) 및 글리코겐증(glycogenosis)을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- <298> 다른 태양에서, 상기 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포는 선천성 대사 이상을 치료하기 위한 유전자 치료에서 자가 또는 이종 이전유전자(transgene) 담체로서 쓰일 수 있는데, 이러한 선천성 대사 이상에는 예를 들어 아드레노류코디스트로피(adrenoleukodystrophy, 예를 들어 co-A 리가아제 결핍증), 이염색 백색질 장애(황산아릴 가수분해효소 A 결핍증, 예를 들어 증상이 나타나거나 증상이 나타나기 전인 영아 후기형 또는 청소년형이 있음), 공세포 백색질 장애(Krabbe병, 갈락토세레브로시다제 결핍증), 산성 지질 분해 효소 결핍증(Wolman 병), 낭종 섬유증, 글리코겐 축적 질환, 하이퍼티로이디즘(hypothyroidism), 겸상 적혈구병(sickle cell anemia), 지중해 빈혈(예를 들어 베타 지중해 빈혈), 페아르손(Pearson) 증후군, 폼페 병, 페닐케톤뇨증(PKU), 포르피리아(porphyrrias), 단풍 시럽뇨병, 호모시스틴뇨증(homocystinuria), 점액다당류증, 만성 육아종 질환 및 티로신혈증 및 테이-삭스(Tay-Sachs) 질환이 있고, 이밖에 고상의 암종이나 다른 병리학적 상태를 치료하는데 쓰일 수 있다.
- <299> 다른 태양에서, 상기 질병, 질환 또는 상태는 하나 이상의 조직의 교체 또는 수리를 요하는 질병, 질환 또는 상태이다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포는 단독으로 또는 제2 유형의 줄기세포, 예를 들어 중간엽 줄기세포 또는 부착성 태반 줄기세포와 함께 간, 이자, 콩팥, 허파, 신경계, 근육계, 뼈, 골수, 가슴샘, 지라, 점액 조직, 생식샘 또는 털의 줄기 또는 전구세포를 보충 또는 교체하기 위한 치료적 이식 절차에서 사용될 수 있다. 본 명세서에서 제공하는 태반 줄기세포는 또한 연골(cartilage), 힘줄(tendon), 또는 인대(ligament)의 보강, 회복 또는 보충의 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어 일정 실시예에서, 보철(prostheses, 예를 들어 엉덩이 보철)은 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군으로부터 자라난 대체 연골 조직 구조물로 피복된다. 다른 실시예에서, 관절(예를 들어 무릎)은 통합 줄기세포군으로부터 자라난 연골 조직 구조물로 재구성된다. 연골 조직 구조물은 또한 여러 가지 다른 유형의 관절을 위한 재건 외과수술에 적용될 수 있다. (이에 대한 프로토콜은 Resnick, D. 및 Niwayama, G. 등, 1988, Diagnosis of Bone

and Joint Disorders, 2d ed., W.B. Saunders Co. 참조). 본 통합 줄기세포군은 외상, 대사 이상, 또는 질병으로부터 발생한 조직 및 장기의 손상을 회복시키기 위해 사용될 수 있다. 그러한 일실시에에서, 환자는, 예를 들어 심근 경색증에 의하여 손상된 심장 조직과 같이 질병에 의하여 손상된 조직 또는 장기를 회복 또는 재생하기 위하여 통합 줄기세포군을 투여받을 수 있다.

<300> 다른 실시 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포는 단독으로 또는 제2 유형의 줄기세포, 예를 들어 중간엽 줄기세포 또는 부착성 태반 줄기세포와 함께 치사량 또는 치사량 미만의 방사능을 쥘 개체에 쓰일 수 있다. 이러한 방사능은 사고, 예를 들어 작업 또는 공격을 막론한 핵 유출 사고에 의하여 우연히 또는 치료, 예를 들어 의료 절차의 일환으로서 피폭될 수 있다. 방사능이 특정 유형(예를 들어 알파, 베타, 감마)인가 여부는 중요하지 않다. 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군은 방사능 피폭 증세, 예를 들어 욕지기, 식욕 감퇴, 무기력, 호흡 곤란, 백혈구수 감소, 만성 빈혈, 피로, 허약, 창백함, 호흡 장애, 권태 감 등의 증상을 하나 이상 저감하는데 쓰일 수 있는데, 이는 이러한 증상이 회복 가능한 방사능 피폭 증세이나 치명적인 증세를 나타내느냐에 무관하다. 다른 태양에서, 상기 개체는 급성 방사능 증후군(ARS) 관련 증세를 하나 이상 가지고 있다. 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군은 치명적 또는 치사량 미만의 방사능을 받은 개체의 조혈계를 부분적으로 또는 완전히 재구성하는데 이용되어, 상기 개체의 조혈계가 부분적 또는 완전한 키메라가 되도록 할 수도 있다. 이러한 키메라 형성은 일시적일 수도 영구적(예를 들어 1, 2, 3 주 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 개월 또는 그 이상)일 수도 있다. 바람직한 한 태양에서, 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군은 상기 개체에게 노출 후 24시간 내에 제공된다. 이 개체에게는 통합 줄기세포군을 노출 후 첫 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18 또는 21시간 안에 투여할 수 있다. 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군은 방사능 노출 후 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주일, 2주일, 3주일, 4주일 또는 5주일 안에 투여할 수도 있다.

<301> 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포를 이용한 개체의 치료 또는 예방적 기술은 그 질병, 질환 또는 상태가 측정할 수 있는 방식으로 어떻게든 좋아지면 효과가 있다고 볼 수 있다. 이러한 개선 효과는 여러 가지 지표에 의해 나타날 수도 있다. 측정 가능한 지표로는 예를 들어 특정 질환, 이상 또는 병태와 관련된 한 생리적 상태 또는 이러한 상태의 집합의 검출 가능한 변화를 포함한다(이러한 변화는 혈압, 심박, 호흡율, 다양한 혈액 세포 타입의 수, 일정 단백질의 혈액 내 수치, 탄수화물, 지질 또는 사이토킨 또는 질병, 이상 또는 병태와 관련된 유전적 표지들의 조절 발현을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다). 본 명세서에서 제공하는 CD34⁺, CD45⁻ 태반 줄기세포로 개체를 치료하는 것은 이러한 지표 중 어느 하나가 상기 치료에 반응하여 정상값에 근접하거나 범위 내에 있는 값으로 변화하면 효과가 있다고 볼 수 있다. 다양한 지표들에 대한 정상 수치는 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 정상 범위를 참조하거나, 또는 그러한 수치들을 대조군과 비교하여 설정할 수 있다. 세포 생착을 위하여 본 명세서에서 제공하는 통합 줄기세포군을 도입, 예를 들어 조혈 생착시키는 경우에 상기 통합 줄기세포군을 도입받은 개체가 세포 생착의 어떠한 징후(예를 들어 생착 세포의 표지가 생김 또는 조직 시료 또는 피 시료에서 나타나거나, 생착 세포가 수행하는 생화학적 기능이 하나 이상 검출될 때)라도 나타나게 되면 이는 성공적이라고 볼 수 있을 것이다. 의학에서, 치료의 효율은 또한 종종 개인의 건강 상태에 대한 개인의 인상과 주관적 느낌에 의하여 특성 지워진다. 그러므로 본 명세서에서 제공하는 줄기 세포 또는 보충된 세포군의 투여 후에 나타나는 개선은 또한 개체의 주관적 개선 느낌, 증가된 웰빙, 증가된 건강 상태, 개선된 에너지 레벨, 또는 그와 유사한 것과 같은 주관적 지표에 의해 특성 지워질 수 있다.

실시 예

<312> 실시예 1: 태반 줄기세포 얻기

<313> 1.1 조직 파괴/효소 소화

<314> 효소 소화에 의하여 태반 조직에서 줄기세포를 얻는 예시 방법은 다음과 같다. 냉동 태반 조직(대략 1×1×0.5 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°C에서 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, 배

양 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°C에서 분당 250 회전으로 흔들며 주면서 가하고, 다시 원심분리한 다음 5% FCS가 보강된 10 mL Hank 배지로 추가 세척하였다. 세포를 배지 위에 발라준 다음 배양하고 부착세포를 선별하였다.

<315> 다음의 방법을 사용할 수도 있다. 태반은 압박 분만 후 24시간 안에 확보한다. 태반을 씻은 다음 탯줄의 모체에서 먼 쪽 끝(distal end)을 지혈기(hemostat)를 집어 조인다. 이 탯줄을 태반과의 경계에서 잘라 멸균 접시로 옮긴다. 지혈기 아래로 탯줄을 자른 다음, 탯줄을 마사지하여 피떡을 없애고 겐타마이신과 암포테리신 B를 함유하는 PBS 500 mL 속으로 옮긴다. 수술용 메스(scalpel)를 써서 탯줄의 부착점으로부터 3인치 반지름으로 잘라 남은 태반 재료를 다듬어낸다. 피떡을 남은 태반 재료에서 뽑아내고 탯줄의 뿌리 부분에 자리잡고 있는 양막-용모막 5 g을 탯줄과 같은 용기로 옮긴다. 이 탯줄과 양막-용모막 조직을 자르고 약 1 mm³ 크기의 조각으로 잘게 다진다. 이 조각을 이어서 1 mg/mL의 콜라겐 분해효소 1A(조직 1 g 당 20 mL)로 1시간 동안 37°C에서 소화한 다음 트립신-EDTA(조직 1 g 당 10 mL)로 37°C에서 30분 동안 소화한다. 5% FBS 함유 PBS로 세 번 씻고, 이 조각을 배양 배지(조직 1 g 당 20 mL)에 재현탁한 다음 T 플라스크로 약 0.22 mL/cm² 비율로 옮긴다.

<316> **1.2 관류**

<317> 분만 후 태반은 출산 24시간 이내에 확보한다. 그 탯줄을 탯줄 집게로 태반 원반으로부터 약 3 내지 4 인치 지점에서 조인다. 이 탯줄을 버리거나 예를 들어 제대 줄기세포를 회수를 위하여 처리 및/또는 생체 재료의 생산을 위한 제대막의 처리를 할 수 있다. 남은 양막과 용모막은 태반에서 잘라내어 태반 모서리에 대략 ¼ 인치를 남겨둔다. 잘라낸 태반 재료는 버린다.

<318> 태반 막의 모서리로부터 시작하여, 양막을 손가락을 이용한 무딘 절개(blunt dissection)로 용모막으로부터 떼어낸다. 양막을 완전히 용모막으로부터 떼어내면 가위로 탯줄 밀동을 따라 잘라서 이 양막을 태반 원반으로부터 떼어낸다. 이 양막은 버릴 수도 있고, 예를 들어 효소 소화에 의하여 줄기세포를 얻기 위하여 처리하거나, 예를 들어 양막 생체 재료를 생산하기 위하여 처리할 수도 있다.

<319> 남은 태반 재료의 태아 쪽의 눈에 보이는 모든 피떡과 잔류 혈액을 멸균 거즈로 씻어낸 다음, 멸균화하는데, 알코올 면봉이 아닌 요오드 면봉으로 문지른다. 이어서 무균 지혈기(hemostat)로 이 탯줄용 집게 아래쪽을 가로질러(crosswise) 집은 다음, 이 지혈기를 돌려서 탯줄을 집게 위로 끌어당겨 주름을 잡는다. 이어서 상기 지혈기 아래의 탯줄을 부분적으로 잘라 집게가 지탱하고 있는 탯줄의 단면을 노출시킨다. 혹은 대안적으로 이 탯줄을 무균 지혈기로 집어 준다. 이어서 이 탯줄을 무균 거즈 위에 놓고 상기 지혈기로 붙잡아 잡아당겨 준다. 다음에 상기 지혈기 바로 아래에서 이 탯줄을 똑바로 잘라 혈관에 가까운 모서리를 다시 집게로 집어 준다.

<320> 전술한 방식으로 노출된 혈관은 보통 정맥 하나와 동맥 둘인데, 이 혈관들을 확인하고 다음과 같이 개방하게 된다. 닫힌 엘리게이터 집게(closed alligator clamp)를 각 혈관의 잘린 쪽 끝을 통하여 밀어 넣음으로써 혈관을 벌려 여는데, 이 때 혈관 벽을 집게로 뚫지 않도록 조심한다. 집게 끝이 탯줄 밀동의 약간 위에 오게 되면 집게를 밀어 넣는 것을 멈춘다. 이 집게를 이어서 살짝 열어 준 다음 혈관에서 서서히 빼 내어 혈관을 확장한다.

<321> 관류 장치나 연동 펌프(peristaltic pump)에 연결된 플라스틱 관을 각 태반 동맥 속에 삽입한다. 250 mL 수집용 백에 연결된 플라스틱 관을 상기 태반 정맥 속에 삽입한다. 이 관에 테이프를 붙인다.

<322> 무균 주사 등급의 0.9% NaCl 용액을 소량 써서 새는 곳을 확인한다. 새는 곳이 없으면 펌프 속도를 늘리고 약 750 mL의 주사 등급 0.9% NaCl 용액을 태반 혈관계로 펌프하여 넣는다. 바깥쪽 모서리로부터 탯줄 쪽으로 태반 원반을 부드럽게 마사지하여 관류를 도울 수도 있다. 수집용 백이 다 차면 플라스틱 관과 백을 이어주는 연결부(coupler)로부터 떼어내고 새 백을 관에 연결한다.

<323> 수집을 마치면 이 수집용 백의 무게를 재고 원심분리하기 위하여 균형을 맞춘다. 원심분리 후 세포 펠렛을 부서뜨리는 일 없이 각 백을 혈장 추출기(plasma extractor) 속에 놓아 둔다. 이어서 백 속의 상층액을 제거하고 버린다. 이 백을 이어서 부드럽게 마사지하고 세포를 남은 상층액에 재현탁한다. 무균 1 mL 주사기를 써서 세포 약 300-500 μL를 시료 채취 커플러(sampling site coupler)를 거쳐 상기 수집용 백으로부터 꺼내고 1.5 mL 원심분리 튜브에 옮긴다. 남은 관류물의 무게와 부피를 측정하고 헤타녹말(hetastarch) 1/3 부피를 이 관류물에 가하여 완전히 혼합하여 준다. mL 당 세포의 수를 측정한다. 혈장 추출기로 적혈구를 관류물로부터 제거한다.

<324> 이어서 태반 세포를 즉시 배양하여 태반 줄기세포를 분리하거나 나중에 쓰기 위하여 냉동보존한다.

1.3 분리된 줄기세포의 배양

- <325>
- <326> **초대 배양:** 초대 배양(primary culture)의 목적은 소화된 태반 조직으로부터 세포를 수립하기 위함이다. 소화한 조직을 배양 배지 속에 현탁하고, Corning T-플라스크 속에 놓은 다음, 이를 37°C의 5% CO₂로 유지되는 가슴 체임버 속에서 배양하였다. 배지의 절반은 5일 배양 후 갈아준다. 세포 밀도가 높은 콜로니는 배양 2주째에 생긴다. 트립신-EDTA로 콜로니를 수확하고, 이어서 2% FBS를 함유하는 PBS로 배양을 중지시킨다. 세포를 원심분리하고 배양 배지에 재현탁하여 과중 증폭 배양물을 제조한다. 이 세포를 배양한 적이 없는 제0계대로 정의한다.
- <327> **증폭 배양물:** 초대 배양에서 수확한 세포, 증폭 배양물에서 수확한 세포 또는 세포 은행에서 해동한 세포를 증폭 배양물의 과중(seeding)에 쓴다. Cell Factory(NUNC사 상표)를 무균 필터를 통한 공기 중 5%의 CO₂로 10분 동안 분당 50 mL/트레이의 비율로 처리하고 이를 37°C의 5% CO₂로 유지되는 가슴 체임버 속에서 덩혀 주었다. 과중할 세포를 트리판블루와 혈구계로 세고, 세포 수, 생존율과 계대수, 배양한 누적 총 수를 기록한다. 세포를 배양 배지 속에 mL 당 약 2.3×10⁴개로, 그리고 트레이 당 110 mL로 상기 Cell Factory에 과중한다. 배양 3~4일 후, 그리고 다시 5~6일 후에 배양 배지를 덜어내고 새 배지로 갈아준 다음 공기 중 5%의 CO₂로 한 번 더 처리해 준다. 세포가 cm² 당 약 10⁵개에 이르면 세포를 트립신-EDTA로 처리하여 수확하고, 2% FBS 함유 PBS로 배양을 중지시킨다. 세포를 이어서 원심분리하고 배양 배지 속에 재현탁한다.
- <328> **실시예 2: 관류물로부터 태반 줄기세포의 분리와 특성 분석**
- <329> 이 실시예에서는 여러 가지 다른 관류 실험으로부터 태반 줄기세포를 수집하고 그 특성을 파악하는 것을 설명한다.
- <330> **실험 재료와 방법**
- <331> 태반 기증자는 사실 제대혈 은행의 회원인 산모로부터 모집하였는데, 이들은 충분한 정보를 얻은 후에 제대혈 수집 후 연구 용도로 실험한 태반을 사용하는 것에 대하여 허락하였다. 태반 기증자들은 또한 냉동 보존을 위한 자신의 제대혈 시료의 정상적인 처리 과정에서 생기는 블라인드화(blinded) 데이터를 사용하는 것도 허락하였다. 이로써 수집한 제대혈과 아래 기술하는 이 실험 방법에 따라 얻은 유출 관류물을 비교할 수 있게 되었다. 모든 기증자 데이터는 기밀로 하였다.
- <332> 탯줄과 태반의 실험 후 이 태반을 실온의 멸균, 단열 용기에 넣고 출산 4시간 이내에 실험실로 옮겼다. 태반은 검사하였을 때 태반이 조각났거나, 제대 혈관의 찢김 등의 손상이 있으면 폐기하였다. 태반은 멸균 용기 속에서 2~20시간 동안 실온(23±2°C)에 두거나 냉장(4°C)하였다. 이 태반을 주기적으로 25±3°C의 멸균 식염수 속에 담그고 세척하여 눈에 보이는 표면 혈액이나 장기 조각을 없앴다. 탯줄을 그 태반 삽입부로부터 약 5 cm 지점에서 가로 절단하고 제대 혈관에 멸균 도관(sterile fluid path)에 연결된 테플론 또는 폴리프로필렌 카테터를 삽관하여 태반을 쌍방향으로 관류할 수 있게 하고 스며 나온 유체를 수집할 수 있게 하였다.
- <333> **태반의 조건화(Placental Conditioning)**
- <334> 태반을 부모 동의서를 받은 다음 제대혈과 함께 분만실에서 얻은 다음 분만 12~24시간 내에 실온에서 처리하였다. 처리 전에 태반의 막을 제거하고 모체 쪽을 씻어 남아 있는 피를 없앴다. 남은 세포를 증식시키고 소집(recruitment)하기에 생리적으로 적합한 환경을 모사(模寫)하고 유지하기 위하여 이러한 태반들을 다양한 조건에서 유지하였다. 제대 혈관은 혈액 시료 채취를 위하여 쓰이는 20 게이지 버터플라이 바늘로 만든 카테터로 삽관하였다. 이 삽관을 2 단위/mL 헤파린(미국 뉴저지주 EJKins-Sinn)과 2 mM EDTA를 함유한 IMDM 무혈청 배지(미국 뉴욕주 GibcoBRL)로 분출 세척(flushing)하였다. 이어서 태반을 헤파린 처리(mL 당 2단위)한 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM)로 분당 15 mL 속도로 10분 동안 관류하고, 그 관류물을 한 시간 내에 모체 쪽으로부터 수집하고 유핵 세포 수를 세었다. 태반 관류는 관류물 약 150 mL를 모을 때까지 분당 50 mL의 속도로 계속하였다. 이 관류물을 "초기 분획(early fraction)"이라고 표시하였다. 수집한 유핵 세포의 수가 마이크로리터 당 100 아래로 떨어질 때까지 태반 관류와 그를 위한 수집 방법을 한 두 차례 반복하였다. 같은 속도로 태반을 계속 관류하자 약 150 mL의 두번째 분획을 얻었는데 이를 "후기 분획(late fraction)"이라고 표시하였다. 이 과정 중에 태반을 부드럽게 마사지하여 관류와 세포 재료의 회수를 도왔다. 스며나온 유체를 관류 회로로 수집하는 데는 동맥 삽관을 통한 중력 배수(gravity drainage)와 흡입을 모두 사용하였다.
- <335> 이 관류물들을 모으고 가벼운 원심분리로 파편이나 혈소판, 탈핵 세포막을 제거하였다. 유핵 세포를 이어서

피콜 하이파크(Ficoll-Hypaque) 밀도 구배 원심분리로 분리하고, 이를 세척한 다음 DMEM 속에 재현탁하였다. 부착성 세포를 분리하기 위하여, $5 \sim 10 \times 10^6$ 개의 세포를 담은 분액을 여러 개의 T-75 플라스크에 각각 나누어 담고 세포를 BioWhittaker사에서 입수한, 시판되는 중간엽 줄기세포 성장 배지(MSCGM) 속에서 배양하면서 조직 배양기(37°C, 5% CO₂) 속에 놓아 두었다. 10~15 일 후 PBS 세척으로 비부착 세포를 상기 플라스크로부터 제거하고, PBS를 MSCGM으로 대체한다. 플라스크를 날마다 점검하여 다양한 부착 세포 유형을 확인하는데, 특히, 섬유모세포 유형의 세포를 확인하고 세포군의 증폭 여부를 점검한다.

<336> 세포 회수와 분리

<337> 세포는 $400 \times g$ 로 15분 동안 실온에서 원심분리하여 관류물로부터 회수한다. 이 세포 펠렛을 2 단위/mL 헤파린과 2 mM EDTA를 함유한 IMDM 무혈청 배지(미국 뉴욕주 GibcoBRL) 속에 재현탁한다. 그 단핵 세포 총분획은 Lymphoprep(노르웨이 오슬로 Nicomed Pharma사의 상표) 등으로 제조사의 권장 방법에 따라 분리하고 그 단핵 세포 분획을 재현탁한다. 세포 수는 혈구계로 세었다. 세포 생존율은 트리판블루 배제법으로 평가하였다. 중간엽 세포는 0.2% EDTA 함유 0.05% 트립신(Sigma사)으로 차등 트립신화함으로써 분리하였다. 부착성 줄기세포를 비롯한 섬유모세포상(狀 fibroblastoid) 세포는 플라스틱 표면에서 5분 내에 탈착하는 반면 다른 부착성 세포군은 20~30분 넘게 배양이 필요하기 때문에 차등 트립신화 처리가 가능하다.

<338> 탈착한 섬유모세포상 세포는 트립신화 처리와 트립신 중화액(TNS, BioWhittaker사)을 이용한 트립신 중화 처리 후 수확하였다. 이 세포를 DMEM으로 세척하고 MSCGM 속에 현탁하였다. 흐름 세포 측정은 Becton-Dickenson사 FACSCalibur 장비와 FITC 및 PE 표지 단일 클론 항체를 이용하여 수행하였는데, 골수 유래 중간엽 줄기세포(MSC)의 공지 표지를 기준으로 선별하였고, CD10, CD34, CD44, CD45와 CD90에 대한 항체가 여기에 포함되었다. 항체는 Becton-Dickinson과 Caltag Laboratories사(미국 캘리포니아주 South San Francisco)에서 구입하였고, SH2, SH3과 SH4 항체 생산용 하이브리도마는 Americal Type Culture Collection에서 입수하였다. 배양 상층액 속 단일 클론 항체의 반응성은 FITC나 PE로 표지한 F(ab)'₂ 염소 항마우스 항체로 검출하였다. 세포 계통 분화는 시중에서 입수할 수 있는 분화 유도과 유지용 배양 배지(BioWhittaker사)를 제조사의 설명에 따라 써서 이를 수 있었다.

<339> 태반 줄기세포의 분리

<340> 상기 배양 플라스크 속의 부착성 세포를 현미경 관찰하자 형태적으로 상이한 세포 유형을 볼 수 있었는데, 방추(spindle) 모양 세포, 큰 핵과 수많은 핵주강(核周腔 perinuclear space) 속 액포를 가진 둥근 세포, 여러 개의 돌기를 가지고 있고, 그 중 하나를 통하여 플라스크에 부착하고 있는 별 모양 세포를 비롯한 세포들이 있었다. 비록 이들 부착성 세포의 특성을 더 파악하려는 시도는 하지 않았으나, 유사한 세포들을 골수, 제대와 말초 혈액의 배양에서도 볼 수 있었기 때문에 이들은 그 속성이 줄기세포가 아니라고 본다.

<341> 중간엽 줄기세포(MSC)와 모양이 비슷한, 세포 덩어리(cluster) 형상의 섬유모세포상(狀) 부착성 세포는 차등 트립신화 처리와 2차 플라스크 속의 계대 배양(subculture)으로 분리하였다. 이 세포는 트립신 처리 후에 모양이 둥글어 보였다. 트립신 처리 후 위상차 현미경으로 이 둥근 세포들을 관찰하자 세포가 고도로 육아(肉芽 granulation) 모양이고 실험실에서 얻거나 BioWhittaker 등의 상업적인 입수처에서 얻는 골수 유래 MSC와 유사하게 나타났다. 계대 배양하자 이 부착성 태반 세포는 그 초기 상태와는 달리 몇 시간 내에 부착하였고 그 특징적인 섬유모세포상 형태를 취하였으며 비교 대상 골수 유래 MSC와 성장 양상이 유사하였다. 더욱이 계대 배양과 배지 교체 도중에 느슨하게 부착하고 있던 단핵 세포들은 씻기어 나갔고, 세포 배양물은 균질적이고 눈에 띄는 비섬유모세포상 세포의 불순물이 없는 상태를 유지하였다.

<342> 흐름 세포 측정

<343> 정제된 초기와 후기 분획 단핵 세포에서 CD34, CD38, SH2, SH3, SH4와 다른 줄기세포 관련 표면 표지가 발견되는 것은 흐름 세포 측정법으로 평가하였다. 한 특정 경우에는 세포를 PBS로 씻고나서 항-CD34 피코에리트린과 항-CD38 이소시아나플루오레세인(미국 캘리포니아주 Mountain View의 Becton Dickinson사)으로 이중 염색하였다.

<344> 또 별도의 실험에서는 별도의 관류를 통하여 얻은 태반 줄기세포를 PLSC-1에서 PLSC-29까지 표시하고 이들 세포에서 CD10, CD29, CD34, CD44, CD45, CD54, CD90, SH2(CD105), SH3(CD73), SH4(CD73)와 HLA-1가 발견되는지를 흐름 세포 측정법으로 평가하였다. PLSC-1 내지 PLSC-3, PLSC-5 내지 PLSC-10, PLSC-15 내지 PLSC-21, PLSC-23, PLSC-26과 PLSC-27로 표시한 부착성 세포는 CD10, CD29, CD54, SH2, SH3 과 SH4에 대하여 양성이고 CD34와

CD45에 대하여 음성으로 나타났다. PLSC-15 내지 PLSC-21, PLSC-23, PLSC-26과 PLSC-27로 표시한 부착성 세포들은 나아가 CD44, CD90과 HLA1에 대해서도 양성으로 나타났다. 아래 표 1을 보라.

<345> mRNA는 부착성 세포인 PLSC-3과 PLSC-6 내지 PLSC-10 세포들로부터 수집하였고, rtPCR은 OCT-4(POU5F)에 대하여 특이적인 프라이머를 써서 수행하였다. 시험한 모든 세포군은 OCT-4 mRNA에 대하여 양성이었다.

<346> 개개의 관류물 실험에서 얻은 태반 줄기세포 (PLSC) 의 특성 분석.

표 1

세포 번호	배 지	생동여부 (비알수)	CD34	CD45	CD10	CD29	CD54	SH2	SH3	SH4	SSEA4	CD44	HLA1	CD90	Oc4
PLSC-1	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-2	BW	Y (6)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-3	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-4	BW	None	-	-											
PLSC-5	BW	Y (9)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-6	BW	Y (26)	-	-	+/양음	+	+	+	+	+					+
PLSC-7	BW	Y (2)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-8	BW	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-9	BW	Y (11)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-10	BW	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					+
PLSC-11	D-5%FCS	Y (9)													
PLSC-12	D-5%FCS	Y (7)													
PLSC-13	D-5%FCS	Y (5)													
PLSC-14	D-5%FCS	Y (9)													
PLSC-15	Anthro-1	Y (7)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-16	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-17	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-18	Anthro-1	Y (8)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-19	BWtoA	Y (17)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-20	BWtoA	Y (40)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-21	BWtoA	Y (9)	-	-	+	+	+	+	+	+	+/				
PLSC-22	BWtoA	FTE													
PLSC-23	Anthro-1	Y (10)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-24	Anthro-1	FTE													
PLSC-25	Anthro-1	FTE													
PLSC-26	Anthro-1	Y (15)	-	-	+	+	+	+	+	+					
PLSC-27	Anthro-1	Y (25)	-	-	+	+	+	+	+	+					

<347> +: 흐름 세포 측정법으로 검출하였거나, OCT-4에 대해서는 RT-PCR로 유전자 발현 검출. -: 미검출. 공란: 표지의 존재를 시험하지 않음. FTE: 세포 증폭 실패. BW-: BioWhittaker사 완전 배지(RPMI 1640 + 10% FBS). D-5%FCS: DMEM-5% FCS. BWtoA: BW 배지에서 Anthro-1 배지로 옮김.

<349> 세포 분화

<350> 별도의 실험에서는 상기 부착성 섬유모세포상 세포가 줄기세포로 나타났다. 이 세포는 시험관내에서 지방세포 계통으로 분화하였는데, 이는 오일 레드(Oil Red) 염료로 검출할 수 있는 기름 방울 형성에서 알 수 있었다. 이 세포는 또한 시험관내에서 신경원(neurogenic) 세포 계통으로 분화하였는데, 이는 신경 세포의 특징인 수상

돌기 모양의 방추(dendrite-like spindle)의 형성과 신경 세포의 두 가지 표지인 신경교 원섬유 산 단백질(神經膠原纖維酸蛋白質 glial fibrillary acidic protein)과 신경 섬유 단백질의 출현에서 알 수 있었다. 이 세포들은 또한 시험관내에서 연골 발생(chondrogenic) 세포 계통으로 분화하였는데, 이는 연골을 제조하는 세포가 생산하는 글리코사아미노글리칸의 출현으로 알 수 있었는데, 이 물질은 파오요드산 Schiff 시약으로 검출할 수 있었다. 별도의 실험에서는 이 태반 줄기세포가 NOD-SCID 마우스 모형으로 분화하지 않는다는 것을 확인하였다.

<351> 실시예 3: 태반 구조로부터 태반 줄기세포의 분리

<352> 1. 실험 재료와 방법

<353> 1.1 관심 대상 표현형의 분리

<354> 정상적인 만기 임신으로부터 서로 다른 태반 세포군을 얻었다. 모든 기증자는 연구 목적을 위하여 자신의 태반이 사용되는데 대하여 전적으로 서면 동의하였다. 태반 줄기세포는 아래 세포원에서 얻었다: (1) 태반 관류물(태반 혈관계를 관류하여 얻음)과 (2) 양막 효소 소화물 (3) 용모막 효소 소화물 (4) 양막-용모막관 효소 소화물과 (5) 제대 효소 소화물. 이들 다양한 조직을 무균 PBS(미국 캘리포니아주 Carlsbad의 Gibco-Invitrogen Corporation)로 세척하고 무균 페트리 접시 위에 각각 올려놓았다. 이들 다양한 태반 조직을 무균 수술용 작은 칼(scalpel)로 잘게 썬 다음 50 mL 원추형 Falcon 튜브 속에 담았다. 잘게 썬 조직을 37°C 물 중탕 속에서 1× 콜라겐 분해 효소(미국 미주리주 세인트루이스 Sigma- Aldrich)로 20분 동안 소화한 다음 원심분리하고, 0.25% 트립신-EDTA(Gibco-Invitrogen Corp)으로 37°C 물 중탕 속에서 10분 동안 소화하였다. 다양한 이들 조직을 소화 후 원심분리하고 무균 PBS(Gibco-Invitrogen Corp)로 헹구어 주었다. 재구성한 세포를 두 차례 걸러주었는데 한 번은 100 μm 세포 체(strainers)로써 한 번은 30 μm 분리용 필터로 걸러 잔류 세포의 매트릭스 또는 세포 파편을 없앴다.

<355> 1.2 세포 생존률 평가와 세포 수 세기

<356> 수동 방식의 트리판블루 배제법을 이용하여 소화 후 세포 수와 그 생존률을 측정하였다. 세포를 트리판블루 염료(Sigma-Aldrich)와 1:1 비율로 섞은 다음 이 세포를 혈구계로 세었다.

<357> 1.3 세포 표면 표지의 특성 분석

<358> HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺인 세포를 특성 분석을 위하여 선별하였다. 이 표현형을 갖춘 세포를 동정하고, 수를 셀 다음, 두 대의 Becton-Dickinson사 흐름세포 측정 장치(flow cytometer)인 FACSCalibur와 FACS Aria(미국 캘리포니아주 산호세 Becton-Dickinson)로 특성을 분석하였다. 이들 다양한 태반 세포를 세포 1백만 개당 약 10 μL 항체의 비율로 교반기 위에서 30 분 동안 실온에서 염색하였다. 아래 나타낸 항-사람 항체를 사용하였다: 이소티오시안산플루오레세인 결합(FITC-conjugated) 단일 클론항체로서, HLA-G(미국 노스캐롤라이나주 Raleigh의 Serotec), CD10(미국 캘리포니아주 산호세의 BD Immunocytometry Systems), CD44(미국 캘리포니아주 산호세의 BD Biosciences Pharmingen)와 CD105(미국 미네소타주 미니애폴리스의 R&D Systems Inc.)에 대한 항체), (피코에리트린(PE) 결합 단일클론 항체로서, CD44, CD200, CD117 및 CD13에 대한 항체(BD Biosciences Pharmingen)), (피코에리트린-CY5(PE Cy5) 결합 스트랩아비딘과 단일 클론항체로서 CD117(BD Biosciences Pharmingen)에 대한 항체), (피코에리트린-Cy7(PE Cy 7) 결합 단일클론 항체로서 CD33과 CD10 에 대한 항체(BD Biosciences)), (알로피코시아닌(APC) 결합 스트랩아비딘과 단일클론 항체로서 CD38에 대한 것(BD Biosciences Pharmingen)), (그리고 바이오틴화 CD90 (BD Biosciences Pharmingen). 배양 후, 이 세포를 한 번 헹구어 주어 결합하지 않은 항체를 씻어내고, 하룻밤 동안 4°C에서 4% 파라포름알데히드(미국 오하이오주 클리블랜드의 USB)로 고정하였다. 다음 날, 이 세포를 두 차례 헹구어 준 다음, 30 μm 필터로 여과하였다. 이어서 세포를 흐름 세포측정 장치에 넣고 실험하였다.

<359> 항 마우스 IgG 항체(BD Biosciences Pharmingen)로 염색한 시료를 음성 대조군으로 사용하여 광전 증배관(PMTube)을 조정하였다. 항 사람 항체 하나만으로 염색한 시료는 양성 대조군으로 사용하여 스펙트럼의 겹침/보상(overlaps/compensation) 정도를 보정하였다.

<360> 1.4 세포 분류와 배양

<361> 아무런 세포 배양도 시작하기 전에 어느 한 집단의 태반 세포(관류물, 양막 또는 용모막 유래)를 7-아미노-악티노마이신 D(7AAD, BD Biosciences Pharmingen)와 관심 대상 표현형에 특이적인 단일클론 항체로 염색하였다. 이 세포를 세포 백만 개 당 항체 10 μL의 비율로 염색하고 실온에서 30분 동안 교반기 위에서 배양하였다. 이어서 BD FACS Aria를 이용하여 이들 세포 중 관심 대상 표현형을 발현하는 살아 있는 세포를 분류하고 배지에

고루 발라주었다. 분류(sorted, 관심 대상 세포군)와 "전체"(all, 분류되지 않은 세포) 태반 세포군을 배지에 발라주어 비교하였다. 세포는 피브로박틴(Sigma- Aldrich) 피복 96 웰 플레이트에 표 2에 나타난 세포 밀도(세포/cm²)로 발라주었다. 이 세포 밀도, 그리고 해당 세포 유형을 이중으로 혹은 삼중으로 배지에 발라주는지 여부는 해당 관심 표현형을 발현하는 세포의 수에 따라 결정하였다.

표 2

<362> 배지에 바른 세포의 밀도

96 웰 플레이트 배양			
배지 표면에 발라준 세포의 밀도			
조 건	분 류(sorted)	전체(all)	전체 최고 밀도
세포원	A		
제1집합	40.6×10 ³ /cm ²	40.6×10 ³ /cm ²	93.8×10 ³ /cm ²
제2집합	40.6×10 ³ /cm ²	40.6×10 ³ /cm ²	93.8×10 ³ /cm ²
제3집합	40.6×10 ³ /cm ²	40.6×10 ³ /cm ²	93.8×10 ³ /cm ²
세포원	B		
제1집합	6.3×10 ³ /cm ²	6.3×10 ³ /cm ²	62.5×10 ³ /cm ²
제2집합	6.3×10 ³ /cm ²	6.3×10 ³ /cm ²	62.5×10 ³ /cm ²
세포원	C		
제1집합	6.3×10 ³ /cm ²	6.3×10 ³ /cm ²	62.5×10 ³ /cm ²
제2집합	6.3×10 ³ /cm ²	6.3×10 ³ /cm ²	62.5×10 ³ /cm ²

<363> 완전 배지(60% DMEM-LG (Gibco)와 40% MCDB-201(Sigma)), (2% 소 태아 혈청(Hyclone Labs.)), (1×인슐린-트랜스페린-셀렌(ITS)), (1×리놀렌산-소 혈청 알부민(LA-BSA)), (10⁻⁹ M 텍사메타손(Sigma)), (10⁻⁴ M 아스코르브산 2-인산(Sigma)), (표피 성장 인자 10 ng/mL (R&D Systems)), (혈소관 유래 성장 인자(PDGF-BB) 10 ng/mL (R&D Systems)) 를 상기 96 웰플레이트의 각 웰에 가하고 이 플레이트를 5% CO₂/37°C 배양기 속에 놓았다. 제7일에 완전 배지 100 μL를 각 웰에 부가하였다. 이 96 웰 플레이트를 약 2주 동안 감시하고, 제12일에 배양물의 최종 평가를 마무리하였다. 이는 태반 줄기세포의 배양에서 매우 초기이며 제0계대 세포를 나타낸다.

<364> **1.5 데이터 분석**

<365> 표준적 게이트 기법을 이용하여 FASCalibur 데이터를 FlowJo (Tree star, Inc) 소프트웨어로 분석하였다. BD FACS Aria 데이터는 FACSDiva 소프트웨어(Becton- Dickinson)로 분석하였다. FACS Aria 데이터는 표준적인 게이트 조절법뿐 아니라 중복 신호 구별 게이트 조절법(doublet discrimination gating)을 사용하여 중복신호(doublet)를 최소화하였다. 모든 결과는 마이크로소프트 엑셀에 정리하였고, 본 명세서의 모든 수치는 평균±표준편차(수치, 평균 표준오차 standard error of mean, SEM) 형태로 나타내었다.

<366> **2. 결과**

<367> **2.1 세포 생존률**

<368> 소화 후 생존률은 수동 트리판블루 배제법(도 1)을 이용하여 평가하였다. (양막, 융모막 또는 양막-융모막 판에서 유래한) 대부분의 소화된 조직의 평균 세포 생존률은 약 70%였다. 양막 유래 세포는 평균 세포 생존률이 74.35%±10.31% (n=6, SEM=4.21), 융모막 유래 세포는 평균 생존률이 78.18%±12.65% (n=4, SEM=6.32), 양막-융모막 판은 평균 생존률이 69.05%±10.80% (n=4, SEM=5.40)이었고 제대 세포는 평균 생존률이 63.30%±20.13% (n=4, SEM=10.06)였다. 관류물 유래의 세포는 소화 처리하지 않았는데, 가장 높은 생존률인 89.98±6.39% (n=5, SEM=2.86)을 나타내었다.

<369> **2.2 세포 계량**

<370> 태반 세포와 제대 세포의 세포군을 분석하여 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 수를 결정하였다. BD FACSCalibur 데이터 분석 결과, 양막, 관류물 그리고 융모막에서 이들 세포의 총수가 가장 많았다. 각각 30.72

±21.80 세포 (n=4, SEM=10.90), 26.92±22.56 세포 (n=3, SEM=13.02)와 18.39±6.44 세포 (n=2, SEM=4.55)였다. 양막-용모막관과 텃줄은 이러한 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 총수가 가장 적었다. 각각 4.72±4.16 세포(n=3, SEM=2.40)와 3.94±2.58 세포(n=3, SEM=1.49)였다.

<371> 마찬가지로 이러한 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 총수를 백분을 분석하자, 양막과 태반 관류물이 이러한 표현형을 발현하는 세포를 가장 높은 비율로 함유하였다(각각 0.0319%±0.0202%(n=4, SEM=0.0101)와 0.0269%±0.0226%(n=3, SEM=0.0130)였다. 도 2 참조). 비록 텃줄은 이러한 관심 대상 표현형을 발현하는 세포를 조금밖에 가지고 있지 않았지만(도 2), 이 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 비율은 세번째로 높았다. 0.020±0.0226%(n=3, SEM=0.0131)(도 2). 용모막과 양막-용모막관은 이 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 비율이 가장 낮았는데, 각각 0.0184±0.0064%(n=2, SEM=0.0046)와 0.0177±0.0173%(n=3, SEM=0.010)이었다(도 2).

<372> BD FACS Aria 데이터에서도 양막, 관류물과 용모막이 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포를 나머지 세포원보다 더 많이 제공하는 것으로 나타나 상기 BD FACSCalibur 분석 결과와 부합하였다. 양막, 관류물, 용모막에서 관심 대상 표현형을 발현하는 세포 총수의 평균은 각각 126.47±55.61 세포(n=15, SEM=14.36), 81.65±34.64 세포(n=20, SEM=7.75)와 51.47±32.41 세포(n=15, SEM=8.37)였다. 양막-용모막관과 텃줄은 이 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 비율이 가장 낮았는데, 각각 44.89±37.43 세포(n=9, SEM=12.48)와 11.00±4.03 세포(n=9, SEM=1.34)였다(데이터 미도시).

<373> BD FACS Aria 데이터는 관류물과 양막이 가장 높은 비율로 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포를 함유하며, 각각 0.1523±0.0227%(n=15, SEM=0.0059)와 0.0929±0.0419%(n=20, SEM=0.0094)임을 나타내었다(FIG. 3). 양막-용모막관은 관심 대상 표현형을 발현하는 비율이 세번째로 높았는데, 0.0632±0.0333%(n=9, SEM=0.0111)였다(도 3). 용모막과 태반 세포원은 관심 대상 표현형을 발현하는 비율이 가장 낮았는데, 각각 0.0623±0.0249%(n=15, SEM=0.0064)와 0.0457±0.0055%(n=9, SEM=0.0018)이었다(도 3).

<374> 각 세포원으로부터 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포들을 동정하고 그 수를 계량한 다음에, 나아가 세포가 세포 표면 표지 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200과 CD105를 발현하는지 여부를 분석하고 특성 파악하였다.

<375> **2.3 태반 관류물 유래 세포**

<376> 관류물 유래 세포는 일반적으로 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105와 CD13표지에 대하여 양성인 것으로 보였다(도 4). 관류물 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 37.15%±38.55%(n=4, SEM=19.28)가 HLA-G 발현), (세포 중 36.37%±21.98%(n=7, SEM=8.31)가 CD33 발현), (세포 중 39.39%±39.91%(n=4, SEM=19.96)가 CD117 발현), (세포 중 54.97%±33.08%(n=4, SEM=16.54)가 CD10 발현), (세포 중 36.79%±11.42%(n=4, SEM=5.71)가 CD44 발현), (세포 중 41.83%±19.42%(n=3, SEM=11.21)가 CD200 발현), (세포 중 74.25%±26.74%(n=3, SEM=15.44)가 CD90 발현), (세포 중 35.10%±23.10%(n=3, SEM=13.34)가 CD38 발현), (세포 중 22.87%±6.87%(n=3, SEM=3.97)가 CD105 발현), (세포 중 25.49%±9.84%(n=3, SEM=5.68)가 CD13 발현).

<377> **2.4 양막 유래 세포**

<378> 양막 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105와 CD13에 대하여 양성이었다(도 5). 양막 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 57.27%±41.11%(n=3, SEM=23.73)가 HLA-G 발현), (세포 중 16.23%±15.81%(n=6, SEM=6.46)가 CD33 발현), (세포 중 62.32%±37.89%(n=3, SEM=21.87)가 CD117 발현), (세포 중 9.71%±13.73%(n=3, SEM=7.92)가 CD10 발현), (세포 중 27.03%±22.65%(n=3, SEM=13.08)가 CD44 발현), (세포 중 6.42%±0.88%(n=2, SEM=0.62)가 CD200 발현), (세포 중 57.61%±22.10%(n=2, SEM=15.63)가 CD90 발현), (세포 중 63.76%±4.40%(n=2, SEM=3.11)가 CD38 발현), (세포 중 20.27%±5.88%(n=2, SEM=4.16)가 CD105 발현), (세포 중 54.37%±13.29%(n=2, SEM=9.40)가 CD13 발현).

<379> **2.5 용모막 유래 세포**

<380> 용모막 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38와 CD13에 대하여 양성이었지만 CD33와 CD105의 발현은 가변적이었다(도 6). 용모막 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 53.25%±32.87%(n=3, SEM=18.98)가 HLA-G 발현), (세포 중 15.44%±11.17%(n=6, SEM=4.56)가 CD33 발현), (세포 중 70.76%±11.87%(n=3, SEM=6.86)가 CD117 발현), (세포 중 35.84%±25.96%(n=3, SEM=14.99)가 CD10 발현), (세포 중 28.76%±6.09%(n=3, SEM=3.52)가 CD44 발현), (세포 중 29.20%±9.47%(n=2, SEM=6.70)가 CD200

발현), (세포 중 54.88%±0.17%(n=2, SEM=0.12)가 CD90 발현), (세포 중 68.63%±44.37%(n=2, SEM=31.37)가 CD38 발현), (세포 중 23.81%±33.67%(n=2, SEM=23.81)가 CD105 발현), (세포 중 53.16%±62.70%(n=2, SEM=44.34)가 CD13 발현.

<381> **2.6 양막-융모막관 유래 세포**

<382> 양막-융모막관 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105와 CD13에 대하여 양성이었다(도 7). 양막-융모막관 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 78.52%±13.13%(n=2, SEM=9.29)가 HLA-G 발현), (세포 중 38.33%±15.74%(n=5, SEM=7.04)가 CD33 발현), (세포 중 69.56%±26.41%(n=2, SEM=18.67)가 CD117 발현), (세포 중 42.44%±53.12%(n=2, SEM=37.56)가 CD10 발현), (세포 중 32.47%±31.78%(n=2, SEM=22.47)가 CD44 발현), (세포 중 5.56%(n=1)가 CD200 발현), (세포 중 83.33%(n=1)가 CD90 발현), (세포 중 83.52%(n=1)가 CD38 발현), (세포 중 7.25%(n=1)가 CD105 발현), (세포 중 81.16%(n=1)가 CD13 발현.

<383> **2.7 태줄 유래 세포**

<384> 태줄 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD33, CD90, CD38, CD105와 CD13에 대하여 양성이었지만 CD117, CD10, CD44와 CD200의 발현은 가변적이었다(도 8). 태줄 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 62.50%±53.03%(n=2, SEM=37.50)가 HLA-G 발현), (세포 중 25.67%±11.28%(n=5, SEM=5.04)가 CD33 발현), (세포 중 44.45%±62.85%(n=2, SEM=44.45)가 CD117 발현), (세포 중 8.33%±11.79%(n=2, SEM=8.33)가 CD10 발현), (세포 중 21.43%±30.30%(n=2, SEM=21.43)가 CD44 발현), (세포 중 0.0%(n=1)가 CD200 발현), (세포 중 81.25%(n=1)가 CD90 발현), (세포 중 64.29%(n=1)가 CD38 발현), (세포 중 6.25%(n=1)가 CD105 발현), (세포 중 50.0%(n=1)가 CD13 발현.

<385> 모든 표지 발현의 평균을 정리한 결과는 도 9에 나타내었다.

<386> **2.8 BD FACS Aria 분류 결과 보고서**

<387> HLA ABC, CD45, CD34와 CD133을 가장 높은 비율로 발현하는 세 가지 서로 다른 세포군(관류물, 양막과 융모막 유래 세포)을 7AAD와 이들 표지에 대한 항체들로 염색하였다. 이 세 종류의 세포군에 대하여 관심 대상 표현형을 발현하는 세포들을 선택하여 세포 분류하였다. BD FACS Aria 세포 분류 결과는 표 3에 나타나 있다.

표 3

<388>

BD FACS Aria 세포 분류 보고서			
세포원	처리한 이벤트 수	분류한 이벤트 수 (관심 대상 표현형)	전체에 대한 %
관류물	135540110	51215	0.037786
양막	7385933	4019	0.054414
융모막	108498122	4016	0.003701

<389> 양성인 세포를 선택적으로 분류하여 얻은 세 종류의 서로 다른 세포군("분류")과 그에 대응하는 비분류 세포군을 배지 표면에 발라준 다음 배양하여 그 결과를 제12일째에 평가하였다(표 3). 분류된 관류물 유래 세포는 세포 밀도 40,600 세포/cm²로 발라주었는데, 작고 둥근 비부착 세포를 낳았다. 관류물 유래 비분류 세포 세 집단 중 둘은 대부분 작고, 둥글며 웰 가장자리에 몇몇 부착세포를 가지는 비부착성 세포를 낳았는데, 이들은 세포 밀도를 40,600 세포/cm²로 하여 배지에 발라주었다. 관류물 유래 비분류 세포 중 배지에 93,800 세포/cm²로 발라준 것들은 대부분 작고, 둥글며 웰 가장자리에 몇몇 부착세포를 가지는 비부착성 세포를 낳았다.

<390> 양막 유래 분류 세포는 배지에 6,300 세포/cm²로 발라주었는데, 작고, 둥근 비부착 세포를 낳았다. 양막 유래 비분류 세포는 밀도를 6,300 세포/cm²로 하여 배지에 발라주었는데, 작고, 둥근 비부착 세포를 낳았다. 양막 유래 비분류 세포 중 밀도를 62,500 세포/cm²로 하여 발라준 것은 작고 둥근 비부착 세포를 낳았다.

<391> 융모막 유래 분류 세포는 배지에 6,300 세포/cm²로 발라주었는데, 작고, 둥근 비부착 세포를 낳았다. 융모막 유래 비분류 세포는 밀도를 6,300 세포/cm²로 하여 배지에 발라주었는데, 작고, 둥근 비부착 세포를 낳았다.

용모막 유래 비분류 세포 중 밀도를 62,500 세포/cm²로 하여 발라준 것은 작고 둥근 비부착 세포를 낳았다.

<392> 대부분의 진술한 비부착성 세포는 배양하였을 때 조직 배양 표면에 부착하였고 섬유모세포상 세포 형상을 띠었다.

<393> 앞서 기술한 내용과 관련 있는 실험 후에 그 태반 줄기세포를 더 배양하고 CD117과 CD133에 대한 항체로 세포를 표지하자, 양성 관측값과 유사한 정도로 유의한 배경 신호(background)가 나타났는데, 여기서는 스트렙트아비딘 결합 항체를 비오틴 결합 피코에리드린(PE)으로 표지하였다. 이 배경 신호 때문에 처음에는 상기 태반 줄기세포가 이 두 표지에 대하여 양성이라고 보았다. 그러나 다른 표지인 APC 또는 PerCP를 사용하자, 이 배경 신호가 줄어들었고, 상기 태반 줄기세포는 CD117과 CD133 양쪽 표지에 대하여 음성이라고 옳게 확인할 수 있었다.

<394> **실시예 4 : 태반 줄기세포 표지 발현의 특성 분석**

<395> 이 실시예에서는 태반 줄기세포의 여러 가지 단백질 발현 표지의 발현 특성을 다음과 같이 분석하기 위하여 고안하였다: CD200⁺, CD105⁺, CD90⁺, CD10⁺, 사○이토케라틴 18⁺, CD34⁻, CD45⁻. 덧붙여 미분화 태반 줄기세포에서 간세포 표지의 기저 발현(baseline expression), 예를 들어 사이토케라틴 18의 발현, 간세포 성장 인자(HGF)의 분비와 탈시알기당단백질 수용체의 발현을 비롯한 특성을 평가하였다.

<396> 태반 줄기세포 표지 발현은 다음의 예시 흐름 세포 측정 방법에 따라 평가하였다. 태반 줄기세포를 먼저 트립신 처리하고나서 얼음 속에서 플루오로크롬 결합 항체와 함께 어두움 속에서 30분 동안 배양한 다음 찬 PBS-2% BSA로 두 차례 헹구어 주고 FACSCalibur(BD Biosciences사)로 분석하였다. 이 분석에 적합한 예시 항체로는 PerCP 결합 항CD34, FITC 결합 항CD105, APC 결합 항CD10과 PE 결합 CD200이 있다. 다른 적절한 항체 시약과 적절한 형광 발색단 조합에는 APC 결합 항HLA-ABC, PE 결합 항CD31, PerCP 결합 항CD45, FITC 결합 항CD38, PE 결합 항CD44, FITC 결합 항사이토케라틴 K(또는 사이토케라틴 18), APC 결합 항CD90, APC 결합 항CD86, FITC 결합 항CD80, FITC 결합 항HLA DR,DQ,DP, PE 결합 항β-2-마이크로글로불린, APC 결합 항CD133과 PerCP 결합 항CD117이 포함된다. 달리 기재하지 않는 한, 이 항체는 BD-Pharmingen사에서 얻을 수 있다. 흐름 세포 측정법 데이터의 분석과 통계 처리는 Flowjo(미국 오레곤주 Ashland의 Tree Star사)로 수행하였다.

<397> 태반 줄기세포가 제조하는 사이토킨은 LincoPlex 지방 생성 분석 키트와 Luminex 장비를 제조사의 설명에 따라 배양한 세포의 상층액에 대하여 사용함으로써 분석하였다.

<398> **실시예 5 : 부티르산나트륨을 이용한 태반 줄기세포의 간세포로의 분화 유도**

<399> 이 실시예에서는 부티르산나트륨을 이용한 태반 줄기세포의 간세포 분화 유도를 위한 예시 방법을 설명한다. 이 방법은 부티르산나트륨 유도된 태반 줄기세포의 특성을 여러 가지 단백질 발현 표지 그리고 사이토케라틴 18(미분화 태반 줄기세포에서 이미 발현 중인 분자)과 탈시알기당단백질 수용체 등의 간세포 특이적 유전자와 간세포 특이적 표지의 발현을 이용하여 분석하도록 고안하였다. 유도된 태반 줄기세포가 세포내 알부민을 생산하고 요소를 분비하는 능력을 평가하였다.

<400> 분화 유도를 위하여 태반 줄기세포를 20% 송아지 태아 혈청(Gibco사), 4 mM L-글루타민(Gibco), 100 단위/mL 페니실린, 100 단위/mL 스트렙토마이신(Gibco)과 10 μg/mL 겐타마이신(Gibco)을 함유하는 Iscove 변형 Dulbecco 배지(IMDM)(Gibco사 번호 31980-030)가 담긴 0.1% 젤라틴 피복 6웰 플레이트 속에 웰 당 약 10⁵개의 밀도로 도포하였다. 젤라틴 용액(0.1 %)은 돼지 젤라틴(Sigma-Aldrich사 번호 G-2500) 0.5 g을 인산 완충 식염수(PBS)(Gibco사 번호 20012-027) 500 mL 속에 약간 가열해 주면서 녹여 만들 수 있다. 플레이트를 젤라틴으로 피복하려면 0.1% 젤라틴 용액 2 mL를 조직 배양용으로 처리한 폴리스티렌 플레이트의 각 웰에 가하여 준다. 이 플레이트를 2시간 동안 배양한 다음 그 젤라틴 용액을 흡입하여 낸다. 이 플레이트를 PBS로 한 차례 씻고 IMDM 2.5 mL를 가하고 이어서 웰 당 세포 10⁵개를 가하여 준다. 선택적으로는, 다음 4일 동안 1 % DMSO(Sigma-Aldrich사)에 노출시키고 이어서 6일 동안 서로 다른 농도(1, 2.5, 5, 10 mM)의 부티르산나트륨(Sigma Aldrich 사 번호 B5887)에 노출시킨다. 배지는 날마다 갈아 준다.

<401> 분화된 세포의 기능을 측정하기 위하여, 초대 배양 접시에서 세포를 꺼내어 제I형 콜라겐 피복 폴리스티렌 12웰 플레이트(BD Biosciences)에 웰 당 세포 약 10⁵개의 밀도로 재도포하여 2차 세포 배양물을 개시한다. 재도포 24시간 후 배지를 갈아주고 재도포 48시간 후에 기능 분석 시험을 한다.

- <402> 실시예 6: 간세포 분화를 위한, 알긴산-폴리-L-리신(alginate-poly-L-lysine) 마이크로캡슐화(microencapsulation)에 의한 태반 줄기세포의 응집
- <403> 이 실시예에서는 알긴산 마이크로캡슐화 기술을 이용하여 태반 줄기세포를 간세포로 분화하기 위한 준비 단계로서 태반 줄기세포를 응집(aggregation)하는 예시 방법을 설명한다.
- <404> 알긴산 폴리-L-리신 캡슐화
- <405> 알긴산 용액은 온도 45°C로 가열한 자기 교반 플레이트를 이용하여 알긴산(Sigma-Aldrich사, 분자량 100,000~200,000 g/mol, G-함량 65~70%) 2.2 g을 무Ca²⁺ DMEM(Gibco사) 100 mL 속에 녹여 만들 수 있다. 이 용액을 이어서 25 마이크론 주사 필터(미국 펜실베이니아주 Fisher Brand사)로 거른다. 세포 함유한 부착성 세포의 단일층을 트립신 배양 후에 떼어 내고 10분 동안 1200 rpm으로 원심분리하고 PBS 속에 현탁한다. 이 세포를 PBS(Gibco)로 두 차례 씻고 그 해당 배지 2 mL 속에 재현탁한 다음 세포 수와 생존율을 트리판블루(Gibco) 배제법으로 측정한다. 세포-알긴산 혼합물을 제조하기 위하여, 과중 밀도를 mL 당 약 5×10^7 개로 한 세포 현탁액 분액 1 mL를 2.2%(w/v) 알긴산 용액 9 mL에 가하여 최종 세포 과중 밀도가 mL 당 약 5×10^6 개인 최종 농도 2.0%(w/v)의 알긴산 용액을 얻는다. 이 용액을 주사 펌프(미국 매사추세츠주 Holliston의 KD Scientific사)에 연결된 10 mL 주사기(BD Biosciences)로 옮긴다. 알긴산 비드는 정전기 비드 발생기(스위스 취리히의 Nisco사)를 이용하여 유속을 시간 당 40 mL, 인가 전압 6.5 kV를 하여 얻을 수 있는데, 지름이 500 μ m인 비드를 낳는다. 이 비드를 145 mM NaCl(Sigma-Aldrich사)과 10 mM MOPS(Sigma-Aldrich사)를 함유하는 CaCl₂(100 mM) 중탕(Sigma-Aldrich사) 속으로 압출하여 실온에서 10분 동안 중합하도록 놓아 둔다. 비드를 중합 단계 뒤에 조직 배양용으로 처리한 T-25 플라스크(BD Bioscience사의 Falcon)로 옮긴다. 5 mL 피펫을 써서 상기 CaCl₂ 용액을 털어내고 그 비드를 HEPS(Gibco) 5 mL로 씻어 준다. 이 완충 용액을 털어내고 그 비드를 (0.05% w/v)의 폴리-L-리신(PLL, Sigma-Aldrich사, 분자량 68,600 g/mol) 5 mL 속에 2분 동안 현탁한다. 이 PLL을 서서히 털어 내고 HEPES로 바꿔주어 비드를 씻고 마지막으로 세포 배양 배지 5 mL 속에 비드를 현탁한다. 배지는 캡슐화 후 예를 들어 제4, 8, 11, 14와 17일째에 갈아준다.
- <406> 캡슐체 내(intracapsular) 세포 생존율 평가
- <407> 비드 속 세포 생존율은 캡슐화 직후 칼세인(calcein, 미국 오리곤주 Eugene의 Molecular Probes사), 에티뎀 호모이량체(Molecular Probes) 염색으로 평가한다. 칼세인은 살아 있는 세포 속에서만 분해되어 형광성 생성물을 낳는 반면 에티뎀 호모이량체는 죽은 세포의 핵 속으로만 편입된다. 칼세인 에티뎀 호모이량체의 촬상에는 각각 495 nm 여기필터와 515 nm와 635 nm의 방출 필터를 갖춘 Zeiss사 Axiovert LSM 레이저 주사 공초점 현미경(독일)을 이용하였다. 구체적으로 지름 500 μ m 비드들의 z-단면을 총 250 μ m 깊이에 걸쳐 10 μ m 구간마다 취하였다. 비드 15개를 분석한 실험을 3회 시행하였다. 디지털화 화상을 Olympus사 MICROSUITE(상표)를 써서 계량하였다. 매 비드의 각 절단면(cross-section)마다 생존율을 평가하였다.
- <408> 탈중합(depolymerization) 후 세포 회수율과 그 평가
- <409> 세포 기능 분석과 세포 응집 크기 계산은 세포를 비드에서 방출한 뒤 매 분석일마다 수행한다. 매 조건하의 매 복제 실험분(replicate)마다 최소 비드 1500개를 분석한다. 비드를 PBS로 씻고 10 mM MOPS(Sigma-Aldrich)와 27 mM NaCl(Sigma-Aldrich)을 함유하는 100 mM 시트르산나트륨(Fisher Scientific)을 37°C에서 30분 동안 가하여 탈중합(depolymerization)을 유도한다. 탈중합 후 회수율을 측정하려면 알고 있는 분량의 세포를 캡슐화하고 곧바로 탈중합한다. 원심분리 후 세포 펠렛과 (비드 입자를 갖고 있지만 비드 그대로를 가지고 있지는 않은) 상층액 양쪽을 (캡슐(capsule)은 염색하지 않는) 트리판블루 배제법으로 세포 수 측정하고 수량을 감안하여(mass balance) 초기 세포군과 대략 같은 수의 세포가 포함되어 있다는 것을 증명한다. 이 방법을 썼을 때 캡슐화한 세포군의 회수율이 98%라고 밝혀져 있다. 방출한 세포를 10분 동안 1200 rpm으로 원심분리하고, 시트르산나트륨 용액을 빨아낸 다음, 세포 펠렛을 PBS(3회)로 씻고 세포 특이적 배지에 재현탁한다. 이 세포의 수를 이어서 전술한 트리판블루 배제법으로 세어 준다.
- <410> 캡슐체 내 세포 응집 크기 측정
- <411> 조직 배양용으로 처리한 T-25 플라스크에서 채취한 비드 시료를 35 mm 마텍 접시(Mattek dish, 미국 매사추세츠주 Ashland의 Mattek사)로 캡슐화 후 곧바로와 분석 제8, 11, 14, 17, 20일에 옮긴다. Zeiss사 Axiovert LSM 레이저 주사 공초점 현미경(독일)을 이용하여 명시야(明視野 bright field) 현미경상을 얻는다. 구체적으로 같

은 세포 응집물(aggregate)을 여러 번 계량하지 않기 위하여 지름 500 μm 비드들의 z-단면을 총 250 μm 깊이에 걸쳐 50 μm 구간마다 취하였다. 비드 15개를 분석한 실험을 3회 시행하였다. 현미경상을 Olympus사 MICROSUITE(상표)를 써서 계량하였다. 간략히 말하여, 현미경상의 배경으로부터 세포 응집물을 구별하기 위하여 색깔 문턱값(color threshold)를 먼저 적용한다. 이어서 응집물의 지름을 평균 입자 지름 측정으로 정한다.

<412> 실시예 7: 사이토케라틴 18의 제자리(in situ) 간접 면역형광과 세포 알부민 분석

<413> 이 실시예에서는 분화한 태반 줄기세포로부터 얻은 간세포가 사이토케라틴 18과 알부민을 발현하는 것을 평가하기 위한 예시 방법을 설명한다. 분화한 세포(적당한 경우 탈중합 후에 회수한 것)를 조직 배양용으로 처리한 24웰 플레이트(BD Bioscience사의 Falcon)로 옮긴다. 구체적으로 이 분리된 세포군을 배지 0.75 mL 속에 세포 약 6×10^4 개 비율로 희석하고 37°C에서 한 시간 동안 배양하여 세포 부착이 일어나게 한다. 이어서 이 세포들을 찬 PBS로 세척하고 PBS 속에 담긴 4% 파라포름알데히드(Sigma-Aldrich)로 실온에서 15분 동안 고정하였다. 이 세포를 찬 PBS로 10분 동안 두 차례 씻고 이어서 1% 소 혈청 알부민(BSA)(Sigma-Aldrich), 0.5% 사포닌(Sigma-Aldrich)과 0.1% 아지드화나트륨(Sigma-Aldrich)를 함유한 찬 사포닌/PBS(SAP) 세포막 투과 완충액으로 10분 동안 두 차례 씻어 준다. 세포 내 알부민을 검출하기 위하여 이 세포를 이어서 토끼 항마우스 알부민 항체(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(미국 캘리포니아주 Irvine의 MP Biomedicals사) 또는 면역동형(isotype) 대조군으로서 정상 토끼 혈청(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(MP Biomedicals사)을 함유한 4°C의 SAP 용액 속에 30분 동안 배양하고, 찬 SAP 완충액으로 10분 동안 두 차례 씻어준 다음 4°C에서 2차 항체인 1:500 희석 FITC 결합 당나귀 항토끼 항체(미국 펜실베이니아주 Westgrove의 Jackson Immuno Labs사)로 30분 동안 처리하여 준다. 사이토케라틴 18의 검출을 위하여, 세포를 4°C에서 토끼 항마우스 사이토케라틴 18 항체(IgG1)(1:50 희석)(Santa Cruz Biotechnology사) 또는 면역동형(isotype) 대조군으로서, 정상 토끼 혈청(1:100 희석)의 IgG1 분획(Santa Cruz Biotechnology)을 함유한 SAP 용액 속에서 30분 동안 배양하고, 이어서 4°C에서 2차 항체인 1:200 희석 FITC 결합 염소 항토끼 항체(미국 펜실베이니아주 Westgrove의 Jackson Immuno Labs사)로 30분 동안 처리하여 준다. 양쪽 항체 염색에서 세포를 찬 SAP 완충액과 찬 PBS로 한 번씩 씻어준다. 컴퓨터 인터페이스를 갖춘 Olympus IX70 도립 현미경으로 형광 사진을 촬영하였다. 시료는 515 nm 필터로 여기하였다. 세포마다 형광 세기값을 Olympus MICROSUITE(상표)로 측정하였다. 각 세포에 대한 실험 세기값은 면역동형 대조군의 평균 세기값을 뺀 다음 계산하였다.

<414> 실시예 8: 글리코겐 염색

<415> 이 실시예에서는 분화한 태반 줄기세포로부터 얻은 간세포의 글리코겐 생산을 평가하기 위한 예시 방법을 설명한다. 탈중합 후 세포를 조직 배양용으로 처리한 24웰 플레이트(BD Biosciences사의 Falcon)로 옮기고 10% 포르말린-에탄올 고정액으로 실온에서 15분 동안 고정하고 이어서 PBS로 씻어 주었다. 고정된 세포를 웰 당 5 mL의 과요오드산 용액(Sigma-Aldrich)에 실온에서 5분 동안 노출시켰다. 글리코겐은 이 과정에서 알데히드로 산화한다. 세포를 PBS로 씻어 과요오드산 용액을 없애고 Schiff 시약 1 mL를 웰마다 가하고 실온에서 15분을 노출시킨다. Schiff 시약은 파라로스아닐린(pararosaniline)과 메타중아황산나트륨의 혼합물로서 반응하였을 때 글리코겐 함유 세포 기관을 염색하는 파라로스아닐린을 방출한다. 이 시약을 씻어내기 위하여 세번째 PBS 세척을 하고 Olympus IX70 현미경과 Olympus 디지털 카메라로 촬영한다.

<416> 실시예 9: 포도당과 락트산 측정

<417> 이 실시예에서는 분화한 태반 줄기세포로부터 얻은 간세포의 포도당과 락트산(lactate)의 소비 및/또는 생산을 평가하는 예시 방법에 대하여 설명한다. 2차 배양물 속 각 세포 유형마다 상층액(1 mL)을 3회 반복 수집하고 Bioprofile Bioanalyzer 400(미국 매사추세츠주 Waltham의 Nova Biomedical)을 써서 포도당과 락트산의 대사 물질을 측정하였다. 매 분석일마다 기저 배지의 포도당과 락트산 측정을 하였고 그 평균 값을 시험 측정값에서 차감하여 흡수 또는 생산량을 산출하였다. 매 조건마다 세포 수를 세어 최종적인 소비 또는 생산 속도를 얻었다.

<418> 실시예 10: 요소 분석

<419> 이 실시예에서는 분화한 태반 줄기세포로부터 얻은 간세포의 요소 생산을 평가하기 위한 예시 방법을 설명한다. 배지 시료를 세포 배양물로부터 직접 채취하여 후속 요소 함량 분석을 위하여 -20°C에서 저장하였다. 요소 함성은 시중에서 입수할 수 있는 키트(미국 텍사스주 Boerne의 StanBio사)로 분석하였다. 요소 표준 물질을 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 연속 희석하여 표준 곡선을 만들었다. 흡광도 측정은 585 nm 방출 필터가 딸린 Biorad 사(미국 캘리포니아주 Hercules 소재)의 모델 번호 680 플레이트 판독기로 이루어졌다. 요소의 양을 배지 시료 수집을 한 날에 기록한 세포 수에 대하여 규격화하였다.

<420> **실시예 11: 알부민 분비 검출을 위한 샌드위치 ELISA**

<421> 이 실시예에서는 분화한 태반 줄기세포로부터 얻은 간세포의 알부민 분비를 평가하기 위한 예시 방법에 대하여 설명한다. 매 분석일에 채취한 배지 상층액 속 분비된 알부민의 검출을 위해서 시중에서 입수할 수 있는 마우스 알부민 ELISA 키트(Bethyl Laboratories사 번호 E90-134)를 사용하였다. 알부민 표준 물질을 7.8에서 10,000 ng/mL로 연속 희석하여 표준 곡선을 만들었다. 흡광도 측정은 450 nm 방출 필터가 딸린 Biorad사(미국 캘리포니아주 Hercules 소재)의 모델 번호 680 플레이트 판독기로 이루어졌다. 알부민의 양을 배지 시료 수집을 한 날에 기록한 세포 수에 대하여 규격화하였다.

<422> **실시예 12: B형 간염 감염의 마우스 모형**

<423> 이 실시예에서는 본 명세서에서 진술한 분화한 태반 줄기세포를 이용하여 B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 마우스 모형에 대하여 설명한다. 이 마우스는 (1) 마우스에 방사선을 조사하고, 이어서 SCID 마우스의 골수를 투여하여 보호한 다음, (2) 이 마우스에 태반 줄기세포로부터 분화한 HBV 감염 간세포를 투여함으로써 생산한다. 이어서 이 마우스에 바이러스 복제나 바이러스 혈액량 저감능이 있는지를 시험할 화합물을 투여한다.

<424> **태반 줄기세포** 부착성 태반 줄기세포는 앞서 실시예 1에서 기술한 방법 하나 이상을 써서 구한다.

<425> **간세포의 제조** 앞서 실시예 4에서 기술한 방법에 따라 태반 줄기세포를 분화한다.

<426> **태반 줄기세포 유래 간세포의 HBV 감염** 알긴산 속의 태반 줄기세포 유래 간세포는 원심분리로 수집되어 브롬화헥시메텐트린(hexidementhrine bromide, 미국 미주리주 세인트루이스의 Sigma-Aldrich사 H-9268) 3 µg과 사람 인터류킨 6(IL-6, 영국 런던의 Preprotech사) 0.5 µg이 보충된 고바이러스가 HBV DNA 사람 혈청 1 mL 속에 현탁된다.

<427> **마우스의 제조** 6~10주령의 CB16F 또는 BNX(베이지/누드/xid) 마우스와 NOD/SCID 마우스를 사용하였다. 마우스에 멸균 먹이와 시프로플록사신(ciprofloxacin, 20 µg/mL)이 든 산성 물을 먹였다. CB16F 마우스(Harlan Laboratories사, 이스라엘 Rehovot의 Weizmann Institute of Animal Breeding)는 신체 조사 총량이 약 4 Gy이 되는 방사선에 노출되었고, 3일 후 150-A ⁶⁰Co 광원(캐나다 온타리오주 Kanata의 Atomic Energy of Canada)에서 나온 감마선 11 Gy에 분당 약 0.7 Gy의 속도로 노출되었다. 인산 완충 식염수 0.2 mL에 담긴 NOD/SCID 마우스 유래의 골수 세포 약 4×10⁶개 내지 약 6×10⁶개를 이 조사받은 마우스에 즉시 이식하였다. 골수 세포는 Omni-Mixer로 인산 완충 식염수 속에서 넙다리뼈와 정강이뼈를 분쇄하여 골수 세포를 얻은 다음 그 세포 현탁액에서 T 세포를 고갈시켜 제조한다. Levite 외, *Transplantation* 8:1~3(1991)을 보라. 골수 이식 후 이 마우스에 날마다 Fortum(Glaxo사) 1 mg을 닷새 동안 복막내 투여한다. 골수 세포 이식 직후에 HBV 감염 태반 줄기세포 유래 간세포(약 5×10⁷)를 이어서 이 조사된 마우스의 신장 섬유 피막 속으로(under the kidney capsule) 또는 췌장 속으로 이식한다. 간세포의 생착은 생검과 헤마톡실린-에오신 염색, 그리고 이식한 조직에서 사람 혈청 알부민을 암호화하는 mRNA이 발현되는 것을 검출하여 평가할 수 있다.

<428> BNX 마우스는 CB16F 마우스처럼 제조하는데, BNX 마우스는 11 Gy로 1회 조사하고 HBV 감염 간세포의 이식이 골수 세포 이식 후 적어도 10일이 지나 이루어진다는 점만 다르다.

<429> **HBV 감염 혈청으로부터의 DNA 추출** 황산도데실나트륨 0.25%, EDTA 5 mmol/L, Tris HCl(pH 8.0) 10 mmol/L와 단백질 분해효소 K(미국 미주리주 세인트루이스의 Sigma) 250 µg/mL를 함유하는 반응 혼합물 400 µL를 단백질 분해효소 K로 소화하여 혈청 100 µL로부터 DNA를 추출한다. 65°C에서 2.5시간 후 DNA 담체(carrier) 1 µg과 BSA 0.5 mg을 가해 준다. DNA를 페놀-클로로포름으로 추출하고 -20°C에서 밤새 에탄올로 침전시킨다. 15분 동안 20,000 g에서 원심분리 후 그 DNA 펠렛을 70% 에탄올로 씻고 말린 다음 물 50 µL 속에 현탁한다.

<430> **마우스 혈청 속 HBV DNA 함량의 측정** HBV DNA의 수는 HBV 특이적 프라이머를 이용한 반정량적 PCR로 측정하였다. PCR 생성물을 표준적인 2% 아가로스겔로 분리하였다. 생성물 50 µL를 점 흡입(dot blot)하고 42°C에서 밤새 동안 적절한 [³²P]-표지한 DNA 조각(영국 Buckinghamshire의 Amersham사 Rediprime DNA 표지 시스템)과 혼성화하였다. 이 흡입물(blot)을 55°C에서 0.1×0.15 mol/L NaCl과 0.015 mol/L 시트르산나트륨, pH 7.0과 1% SDS로 세척하고 X선 필름에 노출한다. 점의 세기를 ELISA 판독기, 예를 들어 Dynatech를 써서 630 nm에서 읽어들이거나 Molecular Dynamics사 컴퓨터 음영계측기 모델 번호 300A로 읽어들이는다. 바이러스 혈액량은 검정한 사람 혈청으로부터 얻은 DNA 시료에를 표준 곡선으로 삼아 측정하는데, 이 시료는 사람 혈청을 정상 마우스

혈청에 회석한 것이며, 100 μ L 시료의 DNA 수가 10^2 에서 10^7 로 함유되어 있다. 바이러스 혈액량이 혈청 1 mL 당 약 5×10^3 미만인 마우스는 감염되지 않은 것으로 본다. 이 실험에서 쓰인 프라이머는 HBV의 공유결합으로 폐쇄된 원형과 완화된 DNA 형태를 모두 인식한다.

<431> HBV의 표면 항원을 인식하는 하나 이상의 항체를 이용한 ELISA를 써서 HBV 혈액형을 대안적으로 또는 추가적으로 측정할 수도 있다.

<432> *생착 간세포에서 공유결합으로 폐쇄된 원형 HBV DNA의 측정* 이 과정은 바이러스 복제의 확인이 필요하면 수행할 수 있다. 원심분리로 수집한 간세포(약 1×10^5)로부터 DNA를 추출하고 이를 물 100 μ L 속에 현탁한다. 그 중 50 μ L를 HBV 특이적 프라이머를 이용한 PCR로 분석하는데, 그 100 μ L 반응 혼합물은 13 Taq Pol 완충액, $MgCl_2$ 2.5 mmol/L, 각 dNTP 0.2 mmol/L, 각 프라이머 50 pmol, BSA 1 mg/mL, Taq 중합효소 1단위(Promega사)를 함유한다. 이 PCR 반응이 94°C에서 2분, 그리고 30회를 94°C에서 1분, 72°C에서 3분 반복하고 최종 연장 반응이 72°C에서 5분이 되도록 프로그래밍한다. 내핵(core) 서열의 일부에 해당하는 DNA 조각을 이용한 점 흡입 혼성화를 써서 PCR 생성물을 2% 아가로스겔로 분석한다. 이 실험은 공유결합으로 폐쇄된 원형 HBV DNA만을 인식하는 프라이머를 써서 한다.

<433> *화합물의 항바이러스 활성 측정* 바이러스혈증의 존재를 확인하면 그 마우스에 항HBV 활성을 시험할 화합물을 투여한다. 투여 경로는 화합물마다 달리 정해지지만 일반적으로 복강내 또는 정맥내 투여이다. 화합물 투여는 감염된 간세포의 이식 후 제6~17일에 이루어진다. 투여 후 제2일과 제9일에 마우스에서 혈청을 뽑은 다음, 항체로 HBsAg(HBV 표면 항원)를, PCR로 공유결합으로 폐쇄된 HBV 원형 DNA(cccHBV)를 검출하여 바이러스 혈액량을 평가한다. 만약 바이러스 혈액량이 화합물을 투여받지 않은 마우스의 혈액량보다 검출 가능하게 줄어들면(예를 들어 통계적으로 유의하게 줄어들면) 그 화합물은 항바이러스성 화합물로 정할 수 있다. 바이러스 혈액량을 존재하는 cccHBV의 양과 비교하여 바이러스 혈액량을 줄이는 그 화합물이 HBV 복제의 억제제인지를 확인할 수도 있다.

<434> **실시예 13: 태반 줄기세포의 연골세포로의 분화 유도**

<435> **13.1 일반적인 방법**

<436> 태반 줄기세포를 연골 발생 분화시키는 것은 예를 들어 이하와 같이 이루어질 수 있다:

- <437> 1. 태반 줄기세포를 MSCGM (Cambrex사) 또는 15% 제대혈 혈청이 보강된 DMEM 속에서 성장시킨다.
- <438> 2. 태반 줄기세포를 멸균 폴리프로필렌 튜브들 속에 나눠 넣는다. 이 세포를 원심분리(5분 동안 $150 \times g$)하고 미완성 연골 발생 배지(Incomplete Chondrogenesis Medium, Cambrex사)로 두 차례 세척한다.
- <439> 3. 마지막 세척 후, 세포를 0.01 g/mL TGF-베타-3을 함유하는 완성 연골 발생 배지(Complete Chondrogenesis Medium, Cambrex사) 속에 5×10^5 세포/mL의 농도로 재현탁한다.
- <440> 4. 0.5 mL의 세포를 15 mL 폴리프로필렌 배양 튜브 하나에 담는다. 이 세포를 $150 \times g$ 에서 5분 동안 펠렛으로 가라앉힌다. 펠렛은 이 배지 속에 그대로 놓아 둔다.
- <441> 5. 튜브의 뚜껑을 느슨히 하여 24 시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 속에서 배양한다.
- <442> 6. 이 세포 펠렛에 2~3일마다 새로이 마련한 완전 연골 발생 배지를 보태어 준다.
- <443> 7. 매일 저속 보르텍스(vortex) 처리하여 펠렛이 배지 속에 현탁되어 있도록 한다.
- <444> 8. 연골 발생 세포의 펠렛은 배양 14~28일째에 수확한다.
- <445> 9. 연골 발생은 예를 들어, 호산성 바탕질(eosinophilic ground substance) 생성의 관찰, 세포 형태 평가 및/또는 RT-PCR에 의한 콜라겐 2와 콜라겐 9 유전자 발현 확인 및/또는 연골 매트릭스 산성 점액다당류(matrix acid mucopolysaccharide)의 생산을 Alcian blue 세포화학 염색으로 확인하는 것과 같은 방법으로 특성 파악할 수 있다.
- <446> 연골 발생의 평가로서 유전자 발현을 측정할 수도 있는데, 초기 연골 발생 표지인 피브로모듈린(fibromodulin)과 연골 올리고머 매트릭스 단백질, 중기 연골 발생 표지인 어그리칸(aggrecan), 베르시칸(versican), 데코린(decorin)과 바이글리칸(biglycan), 그리고 성숙한 연골세포의 표지인 제II형과 X형 콜라겐을 발현을 살핀다.

<447> 진술한 방법으로 태반 줄기세포의 연골 발생(chondrogenesis)으로 유도할 수 있는데, 여기서는 태반 줄기세포를 상기 3단계부터 폴리(L-락트산)(PLLA), 제I형 콜라겐 또는 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE) 등의 나노섬유 스캐폴드 위에서 배양하되 원심분리 단계 4는 생략한다.

<448> **13.2 태반과 제대 줄기세포의 연골 발생 세포로의 분화**

<449> 이 실시예는 태반 줄기세포를 연골 발생 세포로 분화하고 이러한 세포로부터 연골 유사 조직을 발생하는 것을 설명한다.

<450> 연골은 혈관과 림프관, 신경이 없는 조직이다. 연골은 연골세포 밀도가 낮지만(< 5%), 연골세포는 자신을 둘러싼 세포의 매트릭스를 유지하는데 놀라운 효율성을 지닌다. 몸 속에 있는 주된 연골은 세 종류가 있다: (1) 관절에서 관절 운동을 촉진하는 관절 연골, (2) 관절 초승달과 추간관 등에서 충격을 흡수해 주는 섬유 연골, (3) 코와 귀 등에서 해부적 구조 형태를 유지해주는 탄력 연골. 이 세 종류 연골 모두는 그 생화학적 구조가 비슷하다.

<451> 관절 통증은 장애의 주된 원인이고 정형 외과 분야에서 통증 완화 요구에 부응하지 못하고 있는 부분이다. (관절 퇴행을 일으킬 수 있는) 1차 골관절염과 외상은 통증의 두 가지 흔한 원인이다. 미국 인구의 약 9%가 엉덩이나 무릎에 골관절염을 가지고 있고, 매년 2백만회를 넘는 무릎 수술이 이루어지고 있다. 불행히도 현재의 치료법은 연골의 복구보다는 증상의 치료에 더 중점을 두고 있다. 자연적 복구는 해당 부위를 섬유모세포 유사 세포가 침습하고 이를 정상 조직처럼 복원성이나 탄성을 갖추고 있지 않은 섬유 조직을 채울 때 일어나는데, 이 때문에 더 큰 피해를 가져 온다. 역사적으로 선택할 수 있는 치료법에는 조직 이식, 연골 밀 천공(subchondral drilling)이나 관절의 완전한 대체가 포함되었다. 더 최근의 치료법은 그러나 자가 연골세포 주입법인 CARTICEL(등록상표), 히알루론산 주사에 따른 임시적 통증 구제법인 SYNVISC(등록상표)와 ORTHOVISC(등록상표) 그리고 관절 초승달 복구를 위한 성체 중간엽 줄기세포 주사법인 CHONDROGEN(등록상표)을 포함한다. 일반적으로 현재 경향은 연골세포나 줄기세포에 관련한 세포 치료 및/또는 조직 공학 제품 쪽으로 기울어가고 있는 것 같다.

<452> *실험 방법과 재료*

<453> P3(제3계대)인 AC61665와 P5인 AC63919로 표시한 두 개의 태반 줄기세포주, P2인 UC672492와 P3인 UC67477로 표시한 두 개의 제대 줄기세포주를 아래에 그 개요를 적은 연구에서 사용하였다. 사람 중간엽 줄기세포(MSC)를 양성 대조군으로, 골육종 세포주인 MC3T3과 사람 피부 섬유모세포(HDF)들을 음성 대조군으로 사용하였다.

<454> 태반과 제대 줄기세포를 만기 분만한 사람 태반으로부터 효소 소화로 분리하고 정제하였다. 사람 MSC 세포와 HDF 세포는 Cambrex사로부터 구입하였고, MC3T3 세포는 미국 세포 유형 배양 컬렉션(ATCC)으로부터 구입하였다. 사용한 모든 세포주는 폴리프로필렌 원심분리관 속에서 5분 동안 800 rpm으로 펠렛으로 만들었으며, 연골 발생 유도 배지(Cambrex)와 비유도성 기저 MSC 배지(Cambrex사) 양쪽에서 키웠다. 세포 펠렛을 수확하고 제7, 14, 21, 28일에 Alcian Blue를 이용한 글리코사미노글리칸(GAG) 염색 및/또는 시리우스 레드를 이용한 콜라겐 염색으로 조직학 분석하였다. 나아가 콜라겐 유형은 면역 염색으로 판단하였다. 연골 특이적 유전자에 대한 RNA 분석은 제7일과 제14일에 수행하였다.

<455> *결과*

<456> 실험 1: 연골 생성 연구는 세 가지 주목표를 달성하도록 설계하였다: (1) 태반과 제대 줄기세포가 분화하여 연골 조직을 형성할 수 있다는 것을 증명, (2) 태반과 제대 줄기세포가 연골세포로 기능적 분화를 이룰 수 있다는 것을 증명, (3) 대조군 세포주를 평가하여 줄기세포로 얻은 결과를 확인.

<457> 첫째 목표를 위한 예비적 연구에서는 한 태반 세포주를 연골 발생 유도 배지 속에서 세포 펠렛 형태로 배양하였는데, 뼈 형태 형성 단백질(BMP)이 없거나 최종 농도 500 ng/mL로 함유되었다. 연골 발생 유도의 증거를 찾기 위하여 4주 동안 매주 펠렛을 분석하였다. 실험 결과는 시간이 지나면서 세포 펠렛이 실제로 커진다는 것을 가리켰다. 그러나 BMP⁺와 BMP⁻ 시료 사이에는 가시적 차이가 없었다. GAG의 존재를 알아보기 위하여 펠렛을 또한 Alcian Blue로 염색하여 조직학 분석하였는데, GAG는 연골 조직을 가리키는 물질이다. BMP⁺ 세포는 일반적으로 창백한 액포와 함께 대사적으로 더 큰 활성이 있는 것으로 보였는데 반하여, BMP⁻ 세포는 더 작고 진하게 염색되는 핵과 더 작은 세포질(낮은 대사적 활성을 반영한다)을 갖고 있었다. 제7일에 BMP⁺ 세포는 강하게 파란색으로 염색되었지만 BMP⁻는 희미하게 염색될 뿐이었다. 유도 제28일째에는 BMP⁺와 BMP⁻ 세포 양쪽이 거의 같은 수

준으로 Alcian Blue로 염색되었다. 전반적으로 세포 밀도는 시간이 지나면서 증가하였고, 매트릭스는 펠렛을 덮었다. 반면에 MC3T3 음성 대조군 세포주는 Alcian Blue로 염색하였을 때 GAG의 존재가 전혀 나타나지 않았다.

<458> 실험 2: 실험 1의 결과를 기초로 하여 두 개의 태반 줄기세포주와 두 개의 제대 줄기세포주의 연골 분화능을 평가하기 위하여 더 자세한 연구를 설계하였다. Alcian Blue 조직 분석에 더하여 세포를 또한 시리우스 레드로 염색하였는데, 시리우스 레드는 제II형 콜라겐에 특이적이다. 각 세포주에 대하여 유도 배지를 포함하거나 불포함하는 펠렛을 여러 개 만들었다.

<459> 펠렛을 형성한 배양 세포주에 대하여 먼저 거시적인 연골 발생 여부를 대강 관찰하였다. 전반적으로 이 세포주에서는 이르면 제1일째에 펠렛 형성을 볼 수 있었다. 이 펠렛은 시간이 지나면서 커져 튼튼한 매트릭스를 형성하였는데, 빛이 나고 희면서 연골 같아 보였고, 기계적 강도가 세졌다. 육안 관찰 결과 태반 줄기세포나 제대 줄기세포에 의한 펠렛은 MSC 대조군 펠렛보다 훨씬 더 컸다. 비유도성 배지 속의 대조군 펠렛은 제11일째에는 부서지기 시작하였고 제28일에는 연골 발생 유도 배지 속에서 배양한 세포가 만든 펠렛보다 훨씬 더 작았다. 육안으로는 태반 줄기세포나 제대 줄기세포가 형성한 펠렛에 차이가 없었다. 그러나 텍사메타손이 없는 배지에서 개시한 UC67249 줄기세포주는 더 큰 펠렛을 형성하였다. MC3T3 음성 대조군 세포는 펠렛을 이루지 않았다, 그러나 HDF는 펠렛을 형성하였다.

<460> 모든 시험군을 대표하는 펠렛들을 대상으로 GAG와 콜라겐의 조직학 분석을 하였다. 일반적으로 유도 조건하의 줄기세포가 형성한 펠렛은 비유도성 조건하의 펠렛보다 훨씬 더 컸고 온전하게 더 잘 유지되었다. 유도 조건에서 형성된 펠렛에서는 이르면 제7일째에 GAG 생산을 볼 수 있었고, 콜라겐 함량도 시간이 지나면서 늘어났지만, 비유도성 조건에서 형성된 펠렛에서는 거의 콜라겐 형성을 볼 수 없었는데, 이는 희미한 Alcian Blue 염색 결과로 나타났다. 일반적으로 상기 태반 줄기세포와 제대 줄기세포는 육안 관찰시 중간엽 줄기세포보다 더 단단하고 큰 펠렛을 형성하면서 시간이 지남에 따라 더 많은 콜라겐을 생산하는 것으로 보였다. 더욱이 이 연구 도중에 콜라겐은 더 두꺼워지고 콜라겐 유형도 바뀌는 것으로 보였는데, 이는 편광에서 섬유 색깔이 달라진 것으로 증명된다(색깔은 섬유의 두께와 관련 있는데, 두께는 콜라겐 유형을 나타낸다). 비유도 태반 줄기세포는 제II형 콜라겐을 안 만들거나 만들더라도 유도된 줄기세포보다 훨씬 덜 생산하였다. 이 28일 동안 세포 밀도는 매트릭스 생성이 늘어남에 따라 줄어들었는데, 이는 연골 조직의 특징이다.

<461> 이 연구는 태반과 제대 줄기세포를 연골 발생 경로로 분화시킬 수 있으며, 연골 조직을 형성하도록 유도하는 것이 쉽다는 것을 확인하여 준다. 초기 관찰 결과는 이러한 줄기세포를 연골 조직 형성에 있어서 MSC보다 더 선호할 것이라는 점을 가리킨다.

<462> **실시예 14: 나노섬유 스캐폴드에 의한 연골세포로의 분화 유도**

<463> 이 실시예는 나노섬유 스캐폴드를 써서 태반 줄기세포 또는 골수 유래 중간엽 세포(BM-MSC)를 비롯한 줄기세포를 연골세포로 분화하는 것을 설명한다. 이 실시예의 목표는 세 가지이다: (1) 시험관내 태반 줄기세포의 연골 발생 분화의 특성 분석, (2) 시험관내 태반 줄기세포의 연골 발생 분화를 위한 최적 스캐폴드를 결정, (3) 태반 줄기세포-스캐폴드 구조물을 이용한 토끼 모형에서 골연골 결합의 생체내 복구를 평가.

<464> 첫번째 목표를 달성하기 위하여 동적 펠렛(dynamic pellet) 태반 줄기세포 배양을 이용하여 배양 기간을 28일보다 늘렸다. 태반 줄기세포의 연골 발생에 대한 초기와 후기(early and late stage) 표지의 시간적 유전자 발현 분석은 물론 생화학적, 조직학적 분석을 정적 펠렛(static pellet)과 동적 펠렛 세포 배양 양쪽에 대하여 실행했다. 태반 줄기세포는 TGF-β₃를 포함하거나 하지 않은 채 펠렛 세포 배양 방식으로 정적인 조건이나 동적인 조건에서 최대 56일 동안 배양하였다. 실시간 PCR을 써서 초기 표지인 피브로모듈린과 연골 올리고머 매트릭스 단백질의 정량적인 유전자 발현을 분석하였다. 중기 표지인 어그리칸, 베르시칸, 데콜린과 바이글리칸에 대해서도 분석하였다. 성숙한 연골세포의 특징인 제II형과 제IX형 콜라겐과 콘드로어드헤린(chondroadherin)에 대해서도 분석하였다. 제II형 콜라겐, 글리코사미노글리칸과 프로테오글리칸 합성에 대해서도 생화학 분석을 하였다. 연골 발생 세포 펠렛의 조직 형태도 실험 도중에 조직 염색으로 분석하였다.

<465> 두 번째 목표를 달성하기 위하여, 전기 방사 나노섬유 스캐폴드가 태반 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진할 수 있는지를 평가하였다. 폴리(L-락트산)(PLLA), 제I형 콜라겐과 플루오르화비닐리덴과 트리플루오로에틸렌의 공중합체(PVDF-TrFE)로 이루어진 스캐폴드들을 평가하였다. 태반 줄기세포를 이 재료를 써서 만든 스캐폴드에 싣고 정적과 동적 조건 모두에서 세포 배양하였다. 유전자 발현의 정량, 생화학 분석과 조직 분석, 기계적 시험을 실험 도중에 수행하였다.

<466> 세 번째 목표를 달성하기 위하여, 태반 줄기세포의 연골 복구에 대하여 연골 결합을 자연적으로 치유할 능력이 없는 동물 모형, 예를 들어 토끼 골연골 결합 모형을 써서 생체내 기능 평가로 살펴 보았다. 태반 줄기세포와 조합했을 때 이 동물 모형에서 연골 발생 분화를 돕는 스키펠드를 평가하였다. 복구는 조직화학적 염색, 구체적으로 손상 없는 연골과 복구 연골 사이의 연골 융합(cartilage union) 정도를 평가하여 살펴 보았다. 골연골 복구는 또한 원래 결합 자리에서 떼어낸 시료에 대한 기계적 시험을 통해서도 측정하였다.

<467> **14.1 섬유 스키펠드의 제조**

<468> 이 실시예에서는 예시 나노섬유 부직 메시의 제조와 그 특성 분석에 대하여 기술한다. 전기 방사법을 이용하여 나노미터 규모 섬유 메시지를 생산하였다. 이렇게 얻은 메시는 표면적이 넓고 다공도, 구조와 기계적 성질을 조절할 수 있다. 이 방법으로 생산한 섬유는 ECM 섬유와 같은 규모이다. 폴리(L-락트산)(PLLA)과 폴리락트산글리콜산(PLGA)을 고분자 조성물로 사용하였는데, 이것은 이들이 조직 공학 분야에서 가장 널리 쓰이는 생체 재료 중 하나이기 때문이다. 이 스키펠드의 조직 공학용 스키펠드로서의 잠재적 용도를 사람 MSC의 세포 증식과 분화로 평가하였다.

<469> 전압, 유속, 용액의 농도, 모세관-수집기(collector) 거리, 바늘의 지름과 온도 등의 주변 파라미터를 변화시키면 전기 방사 과정이 영향을 받는다. 섬유 지름이 각각 290 nm, 1 μm, 5 μm와 9 μm의 네 가지로 다른 PLLA와 PLGA 스키펠드를 제조하기 위하여, 전압[20 kV]과 바늘에서 수집기 거리[30 cm]를 일정하게 유지하였다. 바늘의 게이지 크기[12G, 22G]와 유속[0.05~0.1 mL/분]과 용액 농도[10~25 w/w%]를 바꾸어 주었다.

<470> 이렇게 하여 얻은 전기 방사 PLLA와 PLGA 매트와 평균 3지름 분포를 표 4에 기재하였다. PLLA와 PLGA 양쪽 모두 미세섬유(microfiber)와 나노섬유 스키펠드는 다공도가 각각 39%와 47%였다. 전기 방사 섬유의 형태는 주사전자 현미경으로 관찰하였는데, 보았을 때 섬유에는 비드가 없었고, 섬유의 모양이 둥글게 보였으며, 부직 방식으로 무작위로 정렬하고 있었다.

표 4

고분자	평균 지름	고분자	평균 지름
PLLA-1	290 ± 84 nm	PLGA-1	380 ± 0.80 nm
PLLA-2	1 ± 0.4 μm	PLGA-2	1 ± 0.3 μm
PLLA-3	5 ± 1.5 μm	PLGA-3	6 ± 1.5 μm
PLLA-4	9 ± 2.0 μm	PLGA-4	9 ± 1.6 μm

<472> **14.2 사람 MSC의 나노섬유 스키펠드 위 세포 파종**

<473> 온(whole) 골수에서 분리하여 계대 배양한 사람 BM-MSC를 미세섬유와 나노섬유 스키펠드에 파종하였다. 세포 배양 플라스틱을 대조군 표면으로 이용하였다. 나노와 미세섬유 스키펠드에서 자란 BM-MSC 모두는 성장 속도 특성이 비슷했다. 세포층의 세포 형태와 균일성은 SEM으로 관찰하였다. 나노섬유에 파종한 세포는 스키펠드 표면에 고루 분포하였던데 반하여, 미세섬유 스키펠드 위의 세포는 원섬유(fibril)를 따라 퍼져 있었고 구성에 관계 없이 분포가 덜 골랐다. 이러한 발견은 액틴 세포 골격 염색과 공촛점 현미경 관찰로 확인하였다.

<474> 정적인 조직 배양 조건하에서 BM-MSC가 연골 발생 분화하는 것에서도 배지 속 유도 인자 없이도 나노섬유 스키펠드한 세포의 제II형 콜라겐 발현이 늘어난 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과는 나노섬유 구조가 배양 배지 속에 유도성 인자가 없어도 연골 발생 분화를 촉진한다는 것을 시사한다.

<475> **14.3 태반 줄기세포의 시험관내 연골 발생 분화**

<476> 전형적인 조건에서 분리하고 증폭한 태반 줄기세포의 연골 발생 능력을 살펴 보기 위하여, 연골 발생 유도 배지의 존재하에서 태반 줄기세포를 세포 펠렛 배양하였다. 이 실험에서 정적 세포 배양(static cell culture) 기간은 펠렛 세포 함량의 감소 때문에 28일까지로 제한되었다. 펠렛의 조직학 절편을 취하여 기능적 분화 여부와 글리코사미노글리칸(GAG)과 콜라겐의 존재를 조사하였다. 나아가 정량적인 단백질과 유전자 발현 분석을 사용하여 펠렛의 성질을 더 분석하였다. 분화된 태반 줄기세포의 면역 표지를 미분화 태반 줄기세포와 비교하였는데, 미분화 태반 줄기세포는 면역 억제성으로 알려져 있다.

<477> 조직학 절편으로부터 태반 줄기세포가 BM-MSC보다 더 밀착한 펠렛을 이룬다는 것을 확인하였다. 태반 줄기세포와 BM-MSC 모두 GAG와 콜라겐 염색이 되었지만 대조군 세포주(사람 피부 섬유모세포(HDF))는 GAG가 없고 콜라겐

이 거의 발현되지 않는 느슨하게 짜인 펠렛을 이루었다.

<478> ELISA와 RT-PCR로 연골 발생을 각각 단백질과 유전자 발현으로 정량하였다. ELISA 데이터는 태반 줄기세포에서 생산한 펠렛 속에 GAG와 제I형 콜라겐이 존재한다는 것을 확인해 주었다. ELISA에서는 제II형 콜라겐을 찾을 수 없었으나, 낮은 수준으로 제II형 콜라겐 유전자가 발현되는 것을 발견하였다. 나아가서 유전자 발현 데이터는 미유도 펠렛과 비교하여 유도된 태반 줄기세포의 펠렛에서 다수의 연골 발생 표지가 상향 조절된다는 것을 확인해 주었다(표 5).

표 5

유전자	상향 조절	유전자	상향 조절
어그리칸 1(Aggrecan 1)	+	제IX형 콜라겐	+
뼈 형태 형성 단백질 2	++	링크 단백질(Link protein)	-
연골 올리고머 매트릭스 단백질	++++	마트릴린 3(Matrilin 3)	+
연골 유래 ret. acid sens	+	부갑상선 호르몬 수용체 1	+
제II형 콜라겐	+	전사 인자 SOX9	+

<479>

<480> (상향 조절 정도: - = 상향 조절 없음, + = 1~10배; ++ = 10~100배, +++ = 100~1,000배; ++++ = 1,000~10,000배)

<481> 미분화 태반 줄기세포와 연골 발생 분화된 태반 줄기세포의 잠재적 면역원성을 비교하기 위하여 흐름 세포 측정을 이용하여 다음 면역계 분자를 염색하여 그 준부를 살폈다: MHC A, B, C와 MHC DR, DP, DQ와 β -2-마이크로글로불린, 그리고 CD86. MHC II와 CD86의 발현이 없는 점, MHC A,B,C와 β -2-마이크로글로불린이 소량으로 양성 발현하는 점은 미분화 태반 줄기세포와 연골 발생 조건하에서 배양한 태반 줄기세포 양쪽이 비슷하였다(표 6).

표 6

<482>

표 지	미분화 태반 줄기세포의 발현	연골 발생 분화된 태반 줄기세포의 발현
MHC 클래스 II	없 음	없 음
CD86	없 음	없 음
MHC A, B, C	낮 음	낮 음
β -2 마이크로글로불린	낮 음	낮 음

<483>

14.4 시험관내 태반 줄기세포의 연골 발생 분화의 특성 분석

<484>

이 실시예에서는 앞서 실시예 14에서 제시하였던 첫번째 목표를 달성하는 예시 방법을 제공한다. 이 실시예에서는 동적 펠렛(dynamic pellet) 세포 배양을 이용하여 배양 기간을 늘렸다. 이러한 배양 기간 연장은 정적 펠렛은 물론 동적 펠렛에서의 태반 줄기세포 연골 발생에 대한 초기와 후기(early and late stage) 표지의 경시적 유전자 발현 분석과 생화학적, 조직학적 분석을 56일까지 할 수 있게 해 준다. 태반 줄기세포는 TGF- β 3를 포함하거나 하지 않은 채 펠렛 세포 배양 방식으로 정적인 조건이나 동적인 조건에서 최대 56일 동안 배양하였다.

<485>

태반 줄기세포는 산후 태반으로부터, 예를 들어 앞의 실시예 1과 같이 하여 분리한다. 파괴한 조직으로부터 태반 줄기세포를 예를 들어, 앞의 실시예 1처럼 낮은 농도로 송아지 태아 혈청과 제한된 성장 인자를 함유하는 완전 배지 속에 수렴한다. 80~85% 세포 함유에 이르면 본 명세서 다른 부분에서 설명한 대로 태반 줄기세포를 계대 배양 및/또는 냉동 보존한다. 분리된 세포가 예를 들어, 적어도 70% 이상 CD200⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD34⁻이고 CD45⁻이라고 보장하기 위하여 흐름 세포 측정을, 예를 들어 앞의 실시예 3의 방식대로 수행한다. 추가적인 태

반 줄기세포의 기능 파악에는 연골 발생 분화 분석이 포함된다.

14.5 정적과 동적 시스템에서의 펠렛 배양

태반 줄기세포의 연골 발생 분화는 다음과 같이 이루어졌다. 태반 줄기세포를 세포 합류에 가까와질 때까지 배양하고, 트립신 처리한 다음 불완전 연골 발생 배지(Cambrex)로 2차례 씻어 주고 전술한 완전 연골 발생 배지에 mL 당 약 500,000 세포의 밀도로 재현탁하였다. 분액 500 μ L씩을 15 mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고 원심분리(800 rpm, 5분)하여 펠렛 형성을 유도하였다. 무혈청 연골 발생 완전 배지(CCM)를 이 원심분리 튜브에 가하여 주는데, 이 배지는 DMEM-저포도당 속에 용해된 피루브산나트륨(Sigma) 1 mM, 아스코르브산-2-인산(Wako) 0.1 mM, 텍사메타손(Sigma) 1×10^{-7} M, ITS(인슐린-트랜스페린-셀렌)(Collaborative Biomedical Products사) 1%, 사람 재조합 TGF- β_3 (Oncogene Sciences) 10 ng/mL로 이루어졌다. 일부 펠렛은 동적 배양을 위하여 무혈청 CCM을 함유하는 생반응기(Synthecon 모델 번호 RCCS-4H)로 옮겼다. 정적 또는 동적 배양 조건의 펠렛은 37°C, 5% CO₂에서 배양하고 배지를 2~3일마다 갈아주었다. 제7, 14, 28과 56일에 배양물에서 펠렛을 들어내고 유전자 발현, 생화학 또는 조직학적 분석을 수행하였다. 정적 조건 또는 동적 조건에서 성장한 MSC와 비교하였다.

분화된 연골세포의 특성을 파악하기 위하여 펠렛을 칼슘과 마그네슘이 없는 HEPES 완충 식염수로 세척하고 37°C에서 제2형 콜라겐 분해효소 3 mg/mL, 히알루로니다제(hyaluronidase) 1 mg/mL, 시트르산 트립신 0.25%로 소화하였다. 소화 후 세포를 원심분리하여 침전시키고 1 mL의 DPBS 완충액 속에 현탁한 다음 세척하였다. 회수한 세포의 양은 트리판블루 세포 수 측정으로 알아 보았다. RNA는 세포를 세포 용해 완충액(lysis buffer)로 용해하여 회수하였다. RNA는 Qiagen사 RNEASY(등록상표) 키트를 써서 분리하였고 Nanodrop 분광광도계로 정량하였다. 연골 발생 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR은 TAQMAN(등록상표) 유전자 발현 프로브를 써서 수행하였다. 유전자 발현 정량은 초기 표지인 피브로모듈린과 연골 올리고머 매트릭스 단백질에 대하여 수행하였다. 중기 표지인 어그리칸, 베르시칸, 데코린과 바이글리칸에 대해서도 분석하였다. 성숙한 연골세포의 특징인 제II형과 X형 콜라겐과 콘드로어드헤린도 분석하였다.

분화된 연골세포의 특성을 더 파악하기 위하여, 효소 면역 측정법(ELISA)을 사용하여 연골 분화된 태반 줄기세포의 단백질 발현을 살펴 보았다. 먼저 펠렛을 용해화하였다. 건조 중량을 쟀 다음 재수화(再水化)한 펠렛을 펩신과 이자 엘라스타제로 소화하였다. 여기서 모은 상층액을 제II형 콜라겐과 프로테오글리칸의 ELISA에 사용하였다. 글리코사미노글리칸(GAG)는 메틸렌블루 염료 결합 분석으로 측정하였다.

분화된 연골세포를 다음과 같은 조직학 분석도 거쳤다. 펠렛을 10% 포르말린으로 고정하고, 농도차가 있는 알코올 용액들(graded alcohols)을 통하여 탈수하고 파라핀 속에 포매(embedding)하였다. 5 μ m 굵기로 절편을 2 자르고 글리코사미노글리칸용 염료(예를 들어 알시안블루 및/또는 사프라닌-O)와 시리우스레드 등의 콜라겐 염료로 염색하였다. 알시안블루는 염기성 구리 프탈로시아닌 염료로서 수용성이며 구리가 있기 때문에 파란색이다. 3% 아세트산 용액(pH 2.5)으로 쓰였을 때 알시안블루 염색은 황산화와 카르복실화된 산성 점액다당류 양쪽과 황산화와 카르복실화된 시알로뮤신 모두를 염색한다. 사프라닌 O의 정염성(正染性 orthochromatic) 형태는 파라핀에 포매된, 포르말린 고정 조직 절편에서 관절 연골, 뮤신과 비만세포 과립(mast cell granule)을 염색한다. 프로테오글리칸은 붉은색으로, 세포질은 녹색으로 물들며, 핵은 검은색으로 염색된다. 시리우스레드 염료는 조직 절편 속 서로 다른 콜라겐을 구별하는데 쓰일 수 있다. 편광 아래에서는 콜라겐 섬유가 어두운 배경에 대하여 밝은 색으로 빛나는 것처럼 보인다. 이 섬유의 색깔은 그 굵기에 따라 달라지는데, 굵기가 커짐에 따라 색깔이 녹색에서 노란색으로 이어 오렌지색, 붉은색으로 바뀐다. 뽀뽀하게 쌓여 있는 굵은 원섬유(fibril)들로 이루어진 굵은 콜라겐 섬유를 형성하는 제I형 콜라겐은 진한 노랑색 재지 붉은색을 띤다. 제III형 콜라겐은 얇은 원섬유가 느슨하게 놓여 있는 얇은 섬유를 이루므로 약한 녹색의 복굴절이 있다. 따라서 나타나는 색깔은 섬유 굵기에서 비롯한 결과이며, 또한 콜라겐 분자의 정렬을 반영한다.

이 연구에서는 네 가지 실험군을 사용한다. 세포를 표준 성장 배지 또는 CCM 속에서 그리고 정적 또는 동적 배양 시스템 속에서 키운다. 정량 분석은 제7, 14, 28와 56일에 행한다. 시료의 크기 n은 모든 정량적인 생화학 분석(글리코사미노글리칸, 제II형 콜라겐, 프로테오글리칸), 유전자 발현과 조직학 분석에서 4로 하였다. 각 시점에서와 시간이 지나면서 실험군 사이의 통계적 차이를 시험하기 위하여, 각각 p<0.05로 단일 방향과 양 방향 ANOVA를 수행하였다. 실험군 사이의 다중적 비교를 위하여 Tukey-Kramer법을 p<0.05로 수행하였다.

14.6 태반 줄기세포의 시험관내 연골발생(chondrogenic) 분화를 촉진하는 스키펴드의 최적화

이 실시예는 위에서 설명된 목적 2를 달성하기 위하여 설계된 실험을 설명한다. 간단히, 태반 줄기세포의 연골 세포로의 분화를 촉진하기 위한 나노섬유 스키펴드의 성능이 시험된다. 조성물과 무관하게, 전기방사 나노섬유

스캐폴드는 위에서 보여진 것처럼 시험관 내에서 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진한다. 스캐폴드 소재로 시험된 물질들은 폴리(L-락티산)(PLLA), 제1형 콜라겐 및 비닐리덴 플루오라이드와 트리플루오로에틸렌(PVDF-TrFE)의 공중합체를 포함한다. 태반 줄기세포는 이러한 물질들로부터 생성된 스캐폴드에 로딩되고, 정적(static) 및 동적(dynamic) 양 조건에서 배양된다. 역학적 시험뿐만 아니라, 정량적 유전자 발현, 생화학적 및 조직학적 분석이 연구 시간 경과에 따라 수행된다.

<494> **14.6.1 스캐폴드 제조 및 특성 분석**

<495> 위에서 설명된 것과 같이, 전기방사 기구는 Harvard Syringe Pump Model 901 상에 설치된 바늘(16-22 게이지)이 장착된 주사기를 포함한다. 주사기는 고분자 용액으로 채워진다. 고전압 전원 장치(Gamma High Voltage Power Supply ES30P)의 양성 출력 리드(lead)는 바늘에 부착된다. 수집기(collector)는 25x30 cm의 크기를 갖는 스테인레스 플레이트이며, 이것은 전기적으로 접지(ground)된다. 전기방사 프로세스는 유속, 용액 농도 및 주사기의 직경을 변경함으로써 영향을 받는다. 용액에 적용된 전압은 20 kV이고, 바늘로부터 수집기까지의 거리는 20 cm이다. 스캐폴드는 수집기에 부착포 매트(nonwoven mat) 형태로 모아진다. 이러한 스캐폴드/매트는 약 200-400 nm의 직경을 갖는 섬유로 이루어진다.

<496> **14.6.2 스캐폴드 제조를 위한 고분자 용액**

<497> 최초 스캐폴드는 폴리 L-락티산(Alkermes Inc., Medisorb Polymer 75/25 DL High IV)의 메틸렌 클로라이드 용액으로부터 전기방사된다. (소 힘줄에서 유래한) 제1형 콜라겐의 유사한 스캐폴드는 콜라겐을 트리플루오로아세트산(TFA)에 용해시켜 제조된다. 피에조일렉트릭 고분자인 p(VDF-TrFE)는 앞서 설명된 것과 같이 메틸 에틸 케톤의 10% 용액으로부터 방사된다. Sachlos and Czernuszka, 2003, *Eur. Cells Mater.* 5:29-40 참조.

<498> **14.6.3 스캐폴드 특성 분석**

<499> 모든 스캐폴드는 다음의 프로토콜에 따라 시험된다. 스캐폴드는 편광 광학 현미경검사 및 전자 주사 현미경 검사(SEM)로 이미지 평가된다. 이미지 분석 기술은 섬유들 사이의 면적 분포뿐만 아니라, 평균 섬유 직경 및 분산 계수를 측정하기 위하여 사용된다. 평균 배열 구멍 부피(average array pore volume) 및 구멍 크기의 섬유 파라미터들은 수은 기공측정(mercury porosimetry)으로 평가된다. 내부 스캐폴드 구조는 SC, TGA, DMA, TMA 및 TSC를 포함하는 적절한 다양한 열적 분석 기술로 모니터링된다.

<500> p(VDF-TrFE) 스캐폴드에 있어, 전류 대 적용된 Sawyer-Tower 회로의 E 필드 스캔이 p(VDF-TrFE) 물질의 분극성(polarizability)을 나타내는 성질들을 표시하기 위하여 사용되었다. 이러한 성질들은 잔류 및 포화 분극성과 강제 필드(coercive field) (극성 전환이 발생하는 E 필드)를 포함한다. 이러한 성질들은 p(VDF-TrFE) 물질들에 있어 잘 알려진 값이다. 진동하는 전극 전기방사된 p(VDF-TrFE) 매트에 주입되거나 방출되는 작은 전류들은 또한 전기계(electrometer)로 측정될 수 있다. 열적 방전 전류(thermal discharge current)(TSC) 기구가 이러한 연구에 사용된다. 전극화된 p(VDF-TrFE) 필름은 고 매그니튜드(10-100 MV/m), 주기적 E 필드에 들어갈 때 길이, 폭 및 두께가 1-10% 스트레인(strain)된다. 이러한 스트레인은 강유전성 결정자 함량이 적용된 필드에 반응할 때 발생한다. 전극화된(electroded) 전기방사 p(VDF-TrFE) 매트에 유사한 스트레인이 발생할 것이라는 점이 기대될 수 있다.

<501> **14.6.4 스캐폴드 파종(seeding)과 분화 프로토콜**

<502> 태반 줄기세포의 연골발생성 분화는 위에서 설명된 것과 같은 매질 및 본 명세서의 다른 부분에서 설명된 것과 같은 방법(예를 들어, 위 4.5 참조)을 사용하여 수행된다. 모든 스캐폴드는 통상적인 기술을 사용하여 약 200,000 세포들이 진공 로딩된다. 예를 들어 Dennis *et al.*, 1998, *Biomaterials* 19:1323-8 참조. 세포-로딩 스캐폴드는 CCM을 포함하는 생반응기(bioreactor)(Synthecon, model #RCCS-4H)에 놓인다. 세포들은 최대 56일 동안 배양 유지된다. 매질은 2-3일마다 교환된다. 양성 대조군인 위에서 설명된 것과 같은 CCM 함유 표준 펠렛 배양 조건으로 스캐폴드 없이 성장한 태반 줄기 세포 및 음성 대조군인 CCM 없이 스캐폴드로 또는 스캐폴드도 없이 (표준 성장 매질에서) 성장한 태반 줄기세포와 비교된다.

<503> **14.6.5 연골 특이적 세포의 매트릭스 성분과 세포 수의 정량적 측정**

<504> 연골발생 펠렛 및 세포-적재 스캐폴드는 7, 14, 28, 및 56일 수확되었고, 글리코사아미노글리칸, 제2형 콜라겐 및 프로테오글리칸이 분석되었다. 이러한 분석들은 96-웰 플레이트 형태를 사용하여 연골 마커의 빠른, 고성능 스크리닝을 가능하게 한다. 그렇게 하기 위하여, 샘플들은 인산 완충 생리식염수로 세척되었고, 200 mL 과파인 용액(2 mM N-아세틸 시스테인 및 2 mM EDTA 1 mg/mL를 함유하는 50 mM 소듐 포스페이트 pH 6.5)으로 16시간

동안 65°C에서 소화되었다. 글리코사미노글리칸 및 프로테오글리칸 합성은 ELISA 키트(BLYSCAN™ Kit, Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY)를 사용하여 정량적으로 측정되었다. 제2형 콜라겐 합성은 ELISA 키트(ArthroGen-CIA, Chondrex, Inc.)를 사용하여 측정되었다. 세포 수는 피코-그린 형광 분석(Molecular Probes, Inc.)을 사용하는 DNA 측정으로 평가되었다.

<505> **14.6.6 조직학 분석에 따른 조직 형태**

<506> 21일 및 35일째에 조직학적 염색 및 관찰이 연골발생 스캐폴드의 세포 및 조직 형태를 분석하기 위하여 사용되었다. 세포 펠렛 및 세포-적재 스캐폴드는 수확되었고, 실온에서 2시간 동안 10% 완충 포르말린으로 고정되었다. 펠렛 및 스캐폴드는 일련의 알코올로 처리하여 탈수되었고, 자이렌과 자이렌 대용물에 의해 처리되어 세척되었으며, 파라핀을 침투시켰다. 얇은 섹션이 슬라이드 마운팅되었고, 톨루이딘 블루와 사프란인 O로 염색되었다.

<507> **14.6.7 발현에서 비롯한 mRNA 변화의 분석**

<508> 앞선 펠렛 배양에서 설명한 바와 같이, 샘플들은 칼슘과 마그네슘이 없는 HEPES 완충 생리식염수로 세척되었고, 3 mgs/ml 제2형 콜라겐아제, 1 mg/ml 히알루로니다제, 및 0.25% 트립신 시트레이트로 37°C에서 소화되었다. 소화 후에, 세포들은 회전 침강되었고, 1 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) 완충액에 재현탁되었고, 세척되었다. 회수된 세포들의 양은 트립신 블루 염색 세포 계수법으로 측정되었다. RNA는 상기 세포들을 용해 완충액으로 용해시켜 얻어진다. RNA는 Qiagen RNEASY(등록상표) 키트를 사용하여 분리되고, Nanodrop을 사용하여 정량된다. 연골발생 유전자 발현에 대한 RT-PCR이 ABI의 TAQMAN(등록상표) 유전자 발현 프로브를 사용하여 수행된다. 정량적 유전자 발현 평가가 피브로모듈린 및 연골 올리고머 매트릭스 단백질인 초기 단계 마커들에 있어 수행된다. 중기-단계(mid-stage) 마커들인 아그레칸(aggrecan), 베르시칸(versican), 데코린 및 비글리칸(biglycan) 또한 시험 된다. 성숙한 연골세포의 특성들인 타입 II 및 X 콜라겐들 및 콘드로어드헤린(chondroadherin)에 대한 유전자들 또한 시험된다.

<509> **14.6.8 통계 분석한 실험군의 수**

<510> 이 연구에서는 여섯 가지 실험군을 사용한다. 세 가지 재료의 조성물(PLLA, 제I형 콜라겐, pVDF-TrFE). 세포는 표준 성장 배지 또는 CCM 속에서 키운다. 정량 분석은 제7, 14, 28와 56일에 행한다. 시료의 크기 n은 모든 정량적인 분석(글리코사미노글리칸, 제II형 콜라겐, 프로테오글리칸)에서 4로 하였다. 각 시점에서와 시간이 지나면서 실험군 사이의 통계적 차이를 시험하기 위하여, 각각 p<0.05로 단일 방향과 양 방향 ANOVA를 수행하였다. 실험군 사이의 다중적 비교를 위하여 Tukey-Kramer 법을 p<0.05로 수행하였다.

<511> **14.7 태반 줄기세포-스캐폴드 구조체를 이용한 토끼 모형에서의 골연골 결합의 생체내 복구 평가**

<512> 이 실시예는 위에서 설명한 목적 3을 달성하기 위하여 설계된 실험들을 설명한다. 간단하게, 연골발생 분화에 도움이 되는 스캐폴드가 태반 줄기세포와 결합하여 토끼에서 연골 결합의 회복에 미치는 영향이 평가된다.

<513> **14.7.1 동물 모델**

<514> 토끼를 이용한 편파-체중 베어링 관절 연골 회복 모델(partial-weight bearing articular cartilage repair model)이 세포/스캐폴드 구조물의 연골발생 효과를 연구하기 위하여 사용된다. 태반 줄기세포를 지지하는 스캐폴드의 수에 따라, 토끼의 수가 결정된다. 뉴질랜드 종인 토끼는 무작위로 군에 지정되었다. 군당 n은 4마리이다. 동물의 평균 체중은 3-5 kg이고, 동물들은 특이 병원균이 없다(specific pathogen free, SPF).

<515> 각 동물의 원위 대퇴골(distal femur)의 융기사이 홈(intercondylar groove)에 3.5 mm 원통형 손상이 만들어지고, 원통형 세포/스캐폴드 구조물이 압축-맞춤 방식으로 그 손상 내에 이식된다. 각 토끼의 반대쪽 무릎이 내부 대조군 역할을 한다. 동일한 손상이 만들어지고, 동일한 조성물의 스캐폴드 및 세포가 없는 구조체가 삽입된다. 내부 대조군의 역할을 하는 무릎은 해당 절차 전에 대조군 무릎으로 왼쪽 또는 오른쪽을 지정하는 불투명 띠개를 사용하여 무작위로 정해진다.

<516> 스캐폴드를 이식하기 위하여, 펜토바르비탈(45 mg/kg)이 정맥으로 투여되어 마취를 시작한다. 마취는 산소와 함께 투여되는 0.5-2% 이소플루란의 흡입으로 유지된다. 토끼는 반듯이 누운 자세로 놓이고, 각 무릎은 면도되고, 절개 부위는 70% 알코올로 문질러 멸균되어 준비된다. 수술 부위는 멸균 드레이프(drape)로 분리된다.

<517> 측면 슬개골근접 절개(lateral parapatellar incision) 및 관절절개가 행해진다. 대퇴부 돌기(femoral condyle)가 슬개골의 중간 탈구에 의해 노출된다. 3.5 mm 드릴 비트가 원위 대퇴골의 융기사이 홈 내에 손상을

생성하기 위하여 사용된다. 손상 깊이는 깊이가 3-5 mm이다. 세포가 있는 스캐폴드 또는 세포가 없는 스캐폴드는 작은 흡수 가능한 봉합 물질(6-0/7-0 vicryl)을 사용하여 그 손상 내에 봉합된다. 상처는 그 후 흡수 가능한 봉합물질로 층을 이루어 밀봉된다. 동일한 절차가 내부 대조군의 역할을 하는 위에서 언급된 반대쪽 무릎에 수행된다.

<518> 수술 후 모든 동물들은 그들의 우리에서 체중-부하(weight-bearing) 된다. 부프레노르핀(buprenorphine) 0.03 mg/kg이 수술 후 통증 조절을 위해 수술 후 첫 5-7일 동안 12시간 간격으로 피하 투여된다. 정상적인 음식물이 제공된다.

<519> 토끼는 수술 12주 후에 치사량의 펜토바르비탈을 사용하여 안락사된다. 각 토끼의 원위 대퇴골이 얻어진다. 회복 부위의 총체적 평가가 정상 주변 조직과의 색깔 및 외관 비교로 기록되며, 조인트 관절(joint arthrosis)의 증거들 또한 기록된다. 표본(각 군당 n=4)은 석회질이 제거되고, 조직학적 평가 및 염색을 위하여 파라핀이 끼워넣어진다. 조직학적 평가는 수정된 O'Driscoll 스코어를 이용하여 수행된다. 군당 N=8 표본들은 역학적 시험(mechanical testing)을 위해 사용된다. 압축 시험이 나노섬유 스캐폴드에 대해 앞서 보고된 프로토콜에 기초하여 수행된다.

<520> **실시예 15: 태반 관류액 속 CD34⁺CD45⁻ 세포군의 확인**

<521> 이 연구의 목적은 짝지운 태반 관류물(액)(HPP) 및 제대 혈액(HUCB) 유닛(n=10)으로부터의 세포를 표현형적으로(phenotypically) 분석 확인하고 비교하며, 태반 관류물에 대한 추가적인 다-파라미터 흐름세포측정(flow cytometry)에 유용한 세포 표면 마커를 확인하는 것이다. 세포의 수준을 평가하기 위하여, 총 유핵 세포(TNC) 및 세포 활성(cell viability) 또한 평가되었다. 해동 후 샘플들은 전임상 또는 임상 연구에서의 그들의 사용 전 세포 상태와 가깝기 때문에, 태반 관류물의 특성 분석은 이러한 샘플에 초점이 맞춰진다. 비교를 목적으로, 각 태반 유닛에 대한 공여자 짝지운(matched) 제대 혈액이 시험되었다. 이러한 프로젝트에서 짝지운(matched) HUCB 유닛을 포함하는 것은 태반 관류물 내 세포군들과 동일한 공여자로부터 모아진 탯줄 제대 혈액 사이의 차이의 평가를 가능하게 한다.

<522> 물질 및 방법: 태반 관류물은 0.9% NaCl을 사용하여 정상 분만 태아의 태반 관류로부터 얻었다. 탯줄 제대 혈액의 짝지운(matched) 유닛이 모아졌고, 표준 방법에 따라 냉동보존되었고, 사용 직전에 해동되었다. 냉동된 HPP 및 HUCB 샘플들은 액체 질소 탱크에서 꺼내와 37°C 중탕 냄비에서 즉시 해동되었다. 세포들은 흐름 세포측정으로 평가되었고, 2% 소 태아 혈청의 PBS로 세포들은 세척되었고, 복합 항체로 염색되었으며, BD FACS Calibur 또는 BD ARIA (Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 분석되었다. 사용된 항체들은 PE-CD34 (BD Cat# 348057) 및 PerCP-CD45 (BD Cat# 340665)이다. 세포 분류 실험들은 적절한 항체로 염색한 후에 수행되었고, 세포들은 MethoCult를 사용하는 표준 CFU 분석 시스템으로 분석되었다.

<523> 결과들: 흐름 세포측정은 CD34⁺CD45⁻ 표현형을 가진 세포들이 HUCB와 비교하여 HPP에서 4배 풍부한 것을 나타내었다(도 10). 표 7의 결과들은 Becton Dickinson의 FACS ARIA 세포 분류를 사용하여 분류된 HPP 및 HUCB 세포들로부터 나온 결과이다. 태반 관류물 줄기 세포들은 다음의 표현형에 따라 선별되었다: CD34⁻CD45⁻, CD34⁺CD45⁻ 및 CD34⁺CD45⁺. 이중 마이너스 세포 타입은 어떠한 CFU도 생성하지 않을 것으로 생각되며, 선별 순도 대조군(sort purity control)으로의 역할만 한다. 상기 CD34⁺CD45⁺ 세포 타입은 표준적인 CB 줄기세포이고, 선별 및 CFU 분석에 있어 양성 대조군의 역할을 한다. 시험 표현형인 CD34⁺CD45⁻은 선별 및 CFU가 가능하도록 충분한 양으로 HUCB에 존재하지 않지만, HPP 세포로부터는 얻어졌다. 표 1에 나타나는 것처럼, HPP로부터의 세포들은 HUCB에서 발견되는 CFU 패턴들과 동일한 패턴을 제공할 뿐만 아니라 많은 수의 CFU-E와 BFU-E를 초래하였다. 게다가, HPP CD34⁺CD45⁺ 세포들은 HUCB에서 검출되지 않고 HUCB 내 CD34⁺CD45⁺ 세포들에 의해 생성되지 않는 군인 CFU-GEMM를 제공하였다.

표 7

CFU DATA											
Unit #	Chart	CD34+; CD45- Cells		CFU-GM		CFU-GEMM		CFU-GEMM		CFU-GEMM	
		3000 cells/well	9000 cells/well	1000 cells/well	3000 cells/well	9000 cells/well	1000 cells/well	3000 cells/well	9000 cells/well	1000 cells/well	3000 cells/well
327950HPP		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB		0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
	CD34+; CD45 Cells										
	CFU-E/BFU-E	150 cells/well	450 cells/well	1000 cells/well	CFU-GM	150 cells/well	450 cells/well	1000 cells/well	CFU-GEMM	150 cells/well	450 cells/well
327950HPP		0	2	0	1	0	0	0	1	0	0
327940CB		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD34+; CD45+ Cells										
	CFU-E/BFU-E	150 cells/well	450 cells/well	50 cells/well	CFU-GM	150 cells/well	450 cells/well	50 cells/well	CFU-GEMM	150 cells/well	450 cells/well
327950HPP		1	4	7	4	4	5	0	0	0	0
327940CB		0	0	1	5	12	0	0	0	0	0
	Duplicate wells										
	CFU-E/BFU-E	3000 cells/well	9000 cells/well	1000 cells/well	CFU-GM	3000 cells/well	9000 cells/well	1000 cells/well	CFU-GEMM	3000 cells/well	9000 cells/well
327950HPP		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327940CB		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	CD34+; CD45- Cells										
	CFU-E/BFU-E	150 cells/well	450 cells/well	1000 cells/well	CFU-GM	150 cells/well	450 cells/well	1000 cells/well	CFU-GEMM	150 cells/well	450 cells/well
327950HPP		0	1	2	1	0	0	1	0	0	0
327940CB		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	CD34+; CD45+ Cells										
	CFU-E/BFU-E	150 cells/well	450 cells/well	50 cells/well	CFU-GM	150 cells/well	450 cells/well	50 cells/well	CFU-GEMM	150 cells/well	450 cells/well
327950HPP		3	2	8	2	2	14	0	0	0	0
327940CB		0	0	0	16	14	0	0	0	0	0

<524>

<525>

<526>

<527>

<528>

<529>

<530>

HPP: 인간 태반 관류물(human placental perfusate)

CB: 제대 혈액(Cord blood)

CFU-E/BFU-E: 콜로니 형성 유닛, 적혈구/모세포 형성 유닛 적혈구

CFU-GM: 콜로니 형성 유닛, 과립구 마크로파지

CFU-GEMM: 콜로니 형성 유닛, 과립구, 적혈구, 단핵구(monocyte), 거대핵세포(megakaryocyte)

다른 연구에서, CD34, CD45, CD31 및 CD45 유전자 발현 레벨이 동일한 태반 관류물(HPP)로부터 분리된 CD34⁺CD45⁻ 및 CD34⁺CD45⁺ 세포군 내에서 비교되었다.

<531> **실험 재료와 방법:** CD34⁺CD45⁻ 및 CD34⁺CD45⁺ 세포군은 위에서 설명한 바와 같이 90% 이상의 세포 순도로 얻어졌고, RNAQUEOUS(등록상표)-4PCR Kit (Ambion, Cat #AM1914)를 이용하여 RNA 제조에 이용되었다. 간단하게, 분리된 세포(5×10^5 cells)는 구아니디늄(guanidinium) 용해 용액으로 용해되었다. 샘플 용해액은 그 후 에탄올 용액과 혼합되었고, 선택적 및 정량적으로 mRNA 및 더 큰 리보솜 RNA와 결합하는 실리카-기반 필터에 적용되었다. tRNA 및 5S 리보솜 RNA와 같은 매우 작은 RNA들은 정량적으로 결합하지 않았다. 필터는 그 후 세척되어 잔류 DNA, 단백질, 및 다른 오염물이 제거되었고, RNA는 중금속을 킬레이팅하는 소량의 EDTA를 포함하는 뉴클레아제가 없는 물로 용출되었다. 실리카 필터는 상기 키트와 함께 공급되는 RNase가 없는 마이크로퓨즈 튜브 내에 맞는 작은 카트리지가 내에 위치되었다. 샘플 용해물, 세척 용액 및 용출 용액들은 원심분리 또는 진공 압력으로 필터를 통해졌다. 필터로부터 용출 후에, 상기 RNA는 소량의 DNA를 제거하기 위하여 키트와 함께 제공되는 초순수 DNase 1으로 처리되었다. 마지막으로, 상기 DNase 및 이가 양이온들은 키트와 함께 제공되는 시약으로 제거되었다. 회수된 RNA의 농도와 순도는 260 및 280 nm에서 그것의 흡수를 측정하여 평가되었다. 상기 RNA는 그 후 TAQMAN(등록상표) Reverse Transcription Reagents(Applied Biosystems, Cat #N8080234)를 사용하는 cDNA 합성에 사용되며, 실시간 PCR 분석이 그 후 CD34(Applied Biosystems, Cat #Hs00990732_m1), CD45(Applied Biosystems, Cat #Hs00236304_m1), CD31(Applied Biosystems, Cat #Hs01065289_m1), 및 CDH5(Applied Biosystems, Cat #Hs00174344_m1)의 Taqman Gene Expression 분석을 사용하는 7900HT Fast Real-Time PCR System으로 수행된다.

<532> **결 과:** 실시간 PCR 분석은 CD34⁺CD45⁻ 및 CD34⁺CD45⁺ 세포 내 CD34 발현은 유사하다는 것을 나타내었다. 기대한 대로, CD34⁺CD45⁻ 세포에서 CD45 발현은 검출되지 않았으나, CD34⁺CD45⁺ 세포에서는 검출 가능하였다. CD34⁺CD45⁺ 세포 내 CD31 발현은 CD34⁺CD45⁻ 세포의 0.05%이었다. CD34⁺CD45⁺ 세포의 CDH5 발현은 CD34⁺CD45⁻ 세포의 13.66%이었다.

<533> **실시에 16: 인간 태반 관류물 속 CD34⁺ 세포의 농축**

<534> 이 실시예는 자기 항체-코팅-비드 분리(magnetic antibody-coated-bead separation, MACS)를 사용하여 인간 태반 관류물에서 CD34⁺ 세포를 농축하는 것에 관해 설명한다.

<535> 인간 태반 관류물로부터의 세포 현탁액이 얻어지고, ACD(anticoagulant citrate dextrose)를 포함하는 MACS 완충액(PBS pH 7.2, + 0.5% BSA + 2 mmol EDTA)에 재현탁된다. 부분표본이 첫 번째 흐름 샘플로부터 모아진다. 6 mL의 Ficoll이 분리된 15 mL 튜브에 첨가되고, 상기 세포 현탁액이 피콜 위에 매우 천천히 층을 이루어 놓인다. 피콜 내 세포 현탁액은 20°C, 35분 동안 중단없이 SC4750 로터 장착 Beckman coulter Allegra X12R 원심분리기에서 300 x g (avg.)로 원심분리된다. 원심분리의 종결 때, 상등액이 주의 깊게 빨아지고, 계면에 위치한 단핵 세포는 분리된 튜브로 모아진다. 이 물질은 총 부피 10 mL의 ACD 함유 MACS 완충액으로 재현탁된다. 부분표본은 두 번째 흐름 샘플에서 모아진다. 세포들은 계수되고, 활성이 체크된다. 세포들은 그 후 15분 동안 4°C에서 SC4750 모터로 400 x g (avg.)로 원심분리된다. 원심분리 종결 후에, 상등액은 빨아내 모아지고, 세포들은 ACD 포함 MACS 완충액을 이용하여 100 µL로 재현탁된다. STEMSEP(상표) 선택 카테일(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC Canada)이 100 µL/1 mL의 세포 농축액($1 \mu\text{L}/2 \times 10^6$ cells 농도)에 첨가된다. 세포 및 카테일은 잘 혼합되고, 10분 동안 4-8°C에서 배양된다. 자기 콜로이드가 60 µL/1 mL의 세포($1 \mu\text{L}/3.33 \times 10^6$ cells 농도)에 첨가된다. 세포들 및 콜로이드들은 잘 혼합되고, 10분 동안 4-8°C에서 배양된다. 10배 부피의 냉동 ACD 함유 MACS 완충액이 그 후 상기 세포들에 첨가되고, 생성되는 용액은 실온에서 8분동안 SC4750 로터로 400 x g (avg.)에서 원심분리된다. 상등액은 빨아서 모아지고, 세포들은 2 mL의 ACD 함유 MACS 완충액에 재현탁된다. 현탁액은 선택적으로 이 시점에서 여과된다. 세 번째 부분표본은 흐름 샘플로부터 모아진다. 세포들은 그 후 프로그램 POSSELD2를 사용하는 AUTOMACS(상표) automated magnetic cell sorter(Miltenyi Biotec) 상에서 분석되고, 수집 튜브들은 위치 "POS 2" 및 "NEG1"에 놓여진다. 약 2 mL의 양성으로 선택된 세포들이 수집된다. 세포 현탁액은 그 후 세척되고 실온에서 10분 동안 400 x g (SC4750 로터)로 원심분리되며, 1 mL의 1% FBS 함유 PBS에 재현탁된다.

<536> **실시에 17: 시험관내 콜로니 형성 단위 분석법**

<537> 총 유핵세포는 헤타녹말 분리법에 의하여 한 단위의 제대혈에서 분리한다. 총 유핵세포는 Ficoll 분리법에 의하여 750 mL의 태반 관류물에서 분리한다. 태반과 제대혈로부터 얻은 총 유핵세포를 메토컬트(Methocult) GF⁺

H4435 배지(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) 또는 2% 소 태아 혈청과 1% 스템스팬 CC100 사이토킨 카테일(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)을 보강한 RPMI 1640 배지가 담긴 35 mm 접시에 세 차례에 걸쳐서 합친다. 세포를 적어도 두 개의 비율(예를 들어, $2 \times 10^5 : 2 \times 10^5$; $1 \times 10^5 : 3 \times 10^5$; $3 \times 10^5 : 1 \times 10^5$)로 통합하고 14일 동안 배양한다. 이어서 세포의 형태를 위상 대조 현미경(phase contrast microscope)으로 관찰하고 콜로니-형성 단위(예를 들어, CFU-GM, CFU-L, CFU-M, CFU-G, CFU-DC, CFU-GEMM, CFU-E)의 총 수를 기록한다. 그 다음 가장 콜로니-형성 단위를 많이 낳는 비율을 판정한다.

<538> 균등물:

<539> 본 발명은 본 명세서에서 기술한 특정 실시 태양의 범위 내로 한정되지 아니한다. 실제로 당업자에게는 앞선 기재와 첨부 도면의 내용으로부터 전술한 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 있을 수 있다는 점은 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부하는 청구범위 내에 포함되는 것이다.

<540> 본 명세서에서 인용하는 많은 간행물, 특허와 특허 출원은 그 전문에서 개시하는 바를 참고 문헌으로 삼고 있다.

도면의 간단한 설명

<302> 도 1은 (A) 관류, (B) 양막, (C) 융모막, (D) 양막-융모막판(amnion-chorion plate) 또는 (E) 제대 줄기세포에서 얻은 태반 줄기세포의 생존률(viability)을 나타낸다. x축의 숫자는 상기 줄기세포를 얻은 태반을 가리킨다.

<303> 도 2는 A) 관류, (B) 양막, (C) 융모막, (D) 양막-융모막판 또는 (E) 제대에서 얻은 세포 중 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 백분율을 FACSCalibur로 측정된 것을 나타낸다. x축의 숫자는 상기 줄기세포를 얻은 태반을 가리킨다.

<304> 도 3은 A) 관류, (B) 양막, (C) 융모막, (D) 양막-융모막판 (E) 제대에서 얻은 세포 중 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 백분율을 FACS Aria로 측정된 것을 나타낸다. x축의 숫자는 상기 줄기세포를 얻은 태반을 가리킨다.

<305> 도 4는 태반 관류물에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.

<306> 도 5는 양막에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.

<307> 도 6은 융모막에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.

<308> 도 7은 양막-융모막판에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.

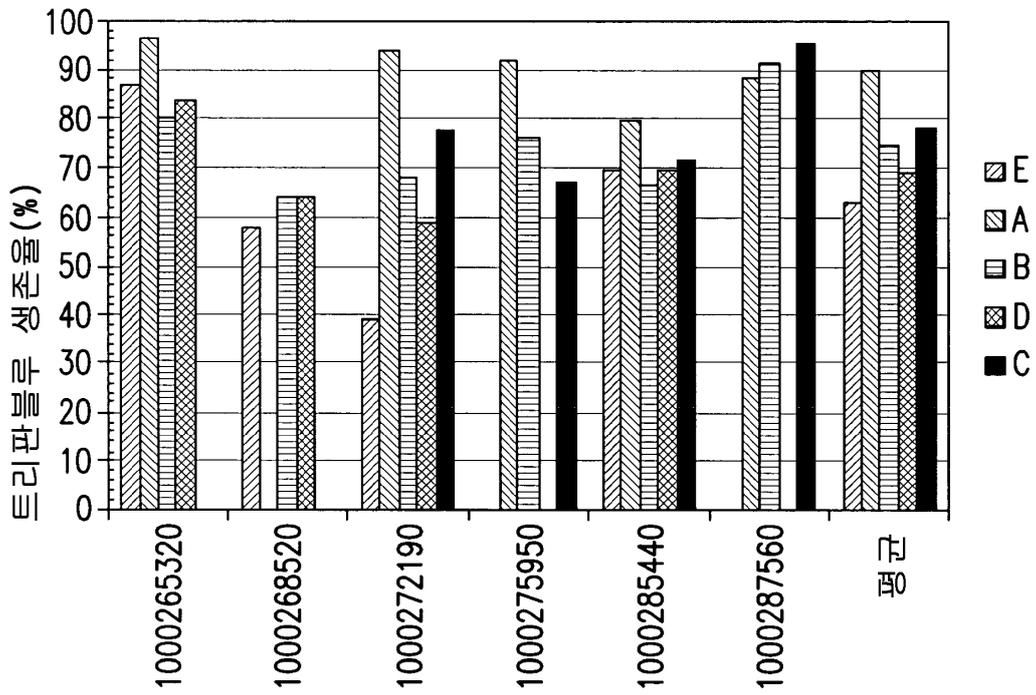
<309> 도 8은 제대에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.

<310> 도 9는 A) 관류, (B) 양막, (C) 융모막, (D) 양막-융모막판 또는 (E) 제대 유래의 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 평균 발현을 나타낸다.

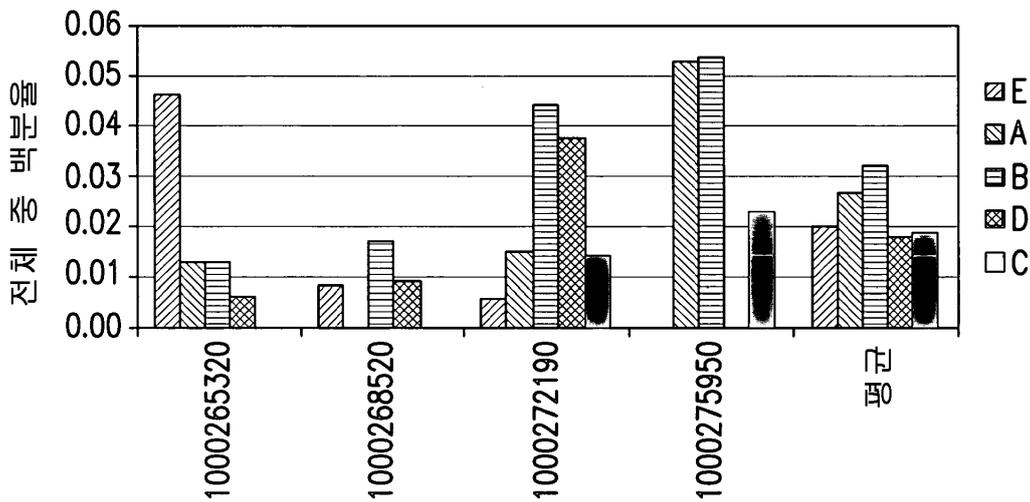
<311> 도 10은 6개의 짝지운(matched) 사람 태반 관류물과 제대혈 단위들에서 얻은 총세포의 백분율 평균이다. X축은 Y축에 나타낸 표현형이 총 유헥세포에서 차지하는 세포 백분율이다.

도면

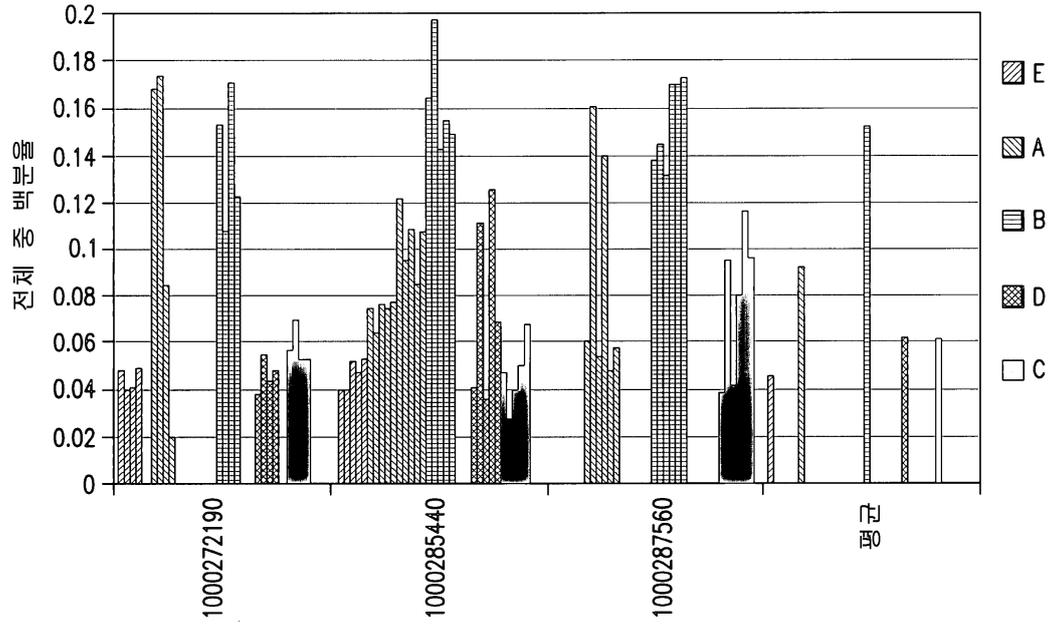
도면1



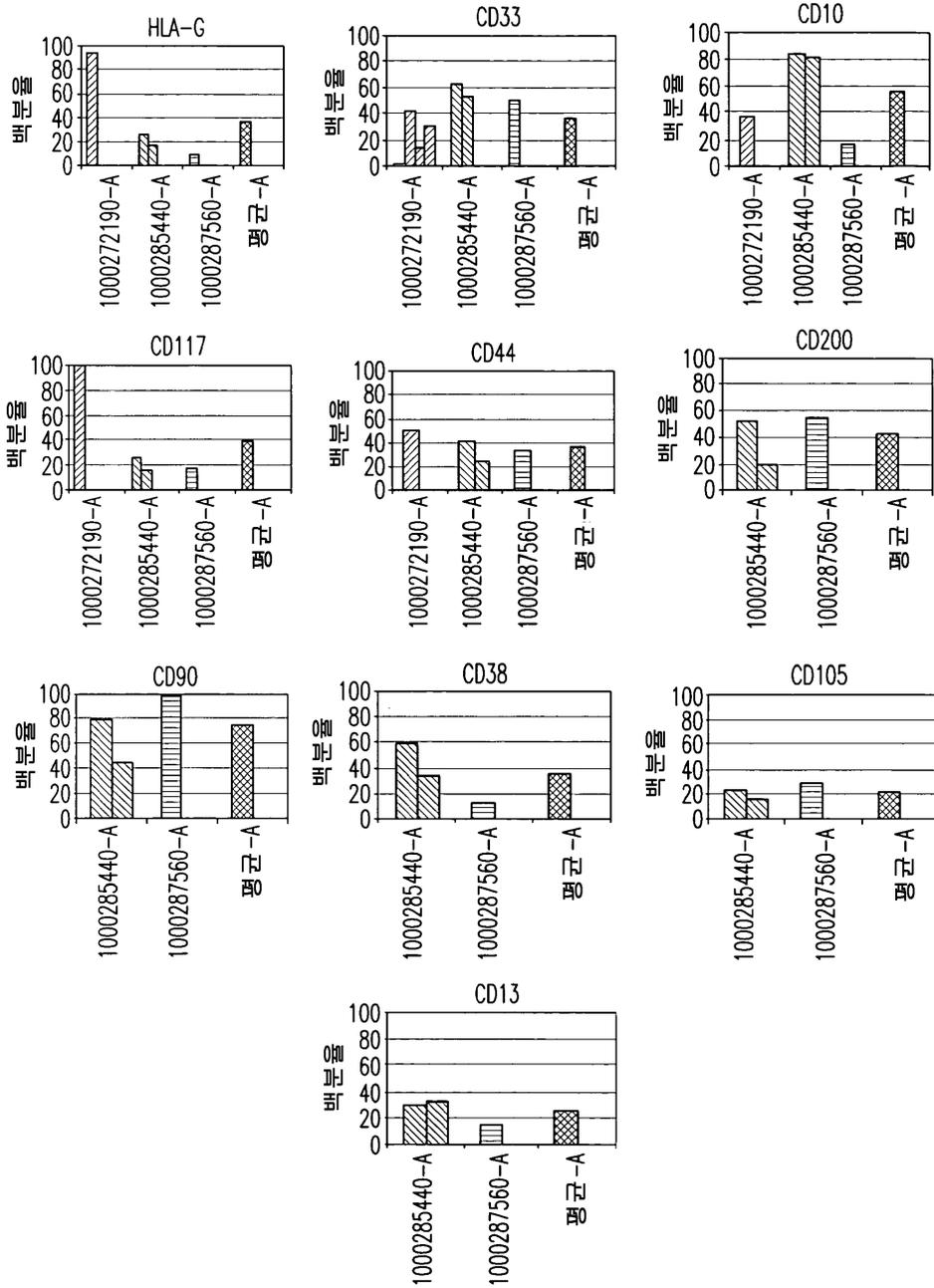
도면2



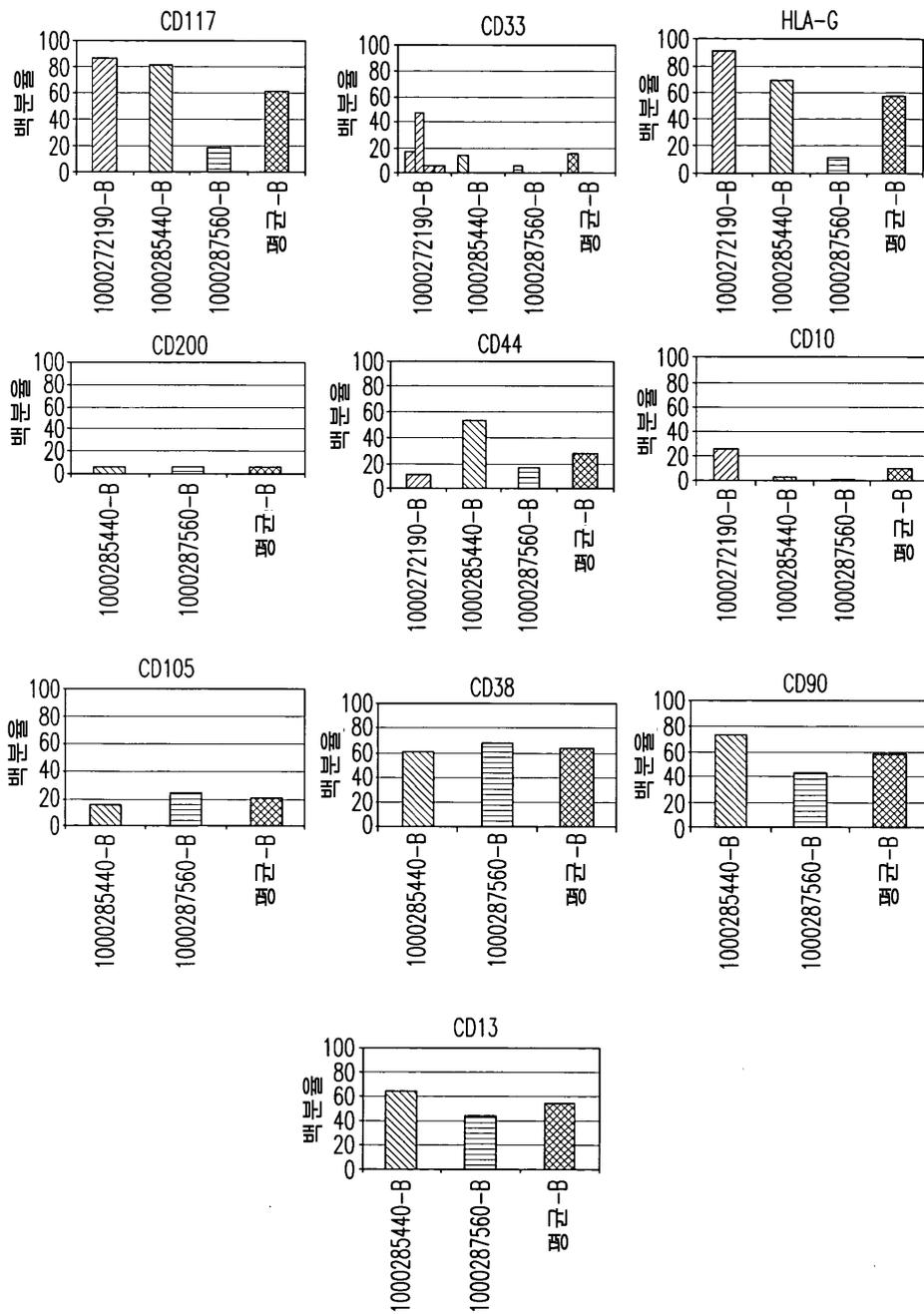
도면3



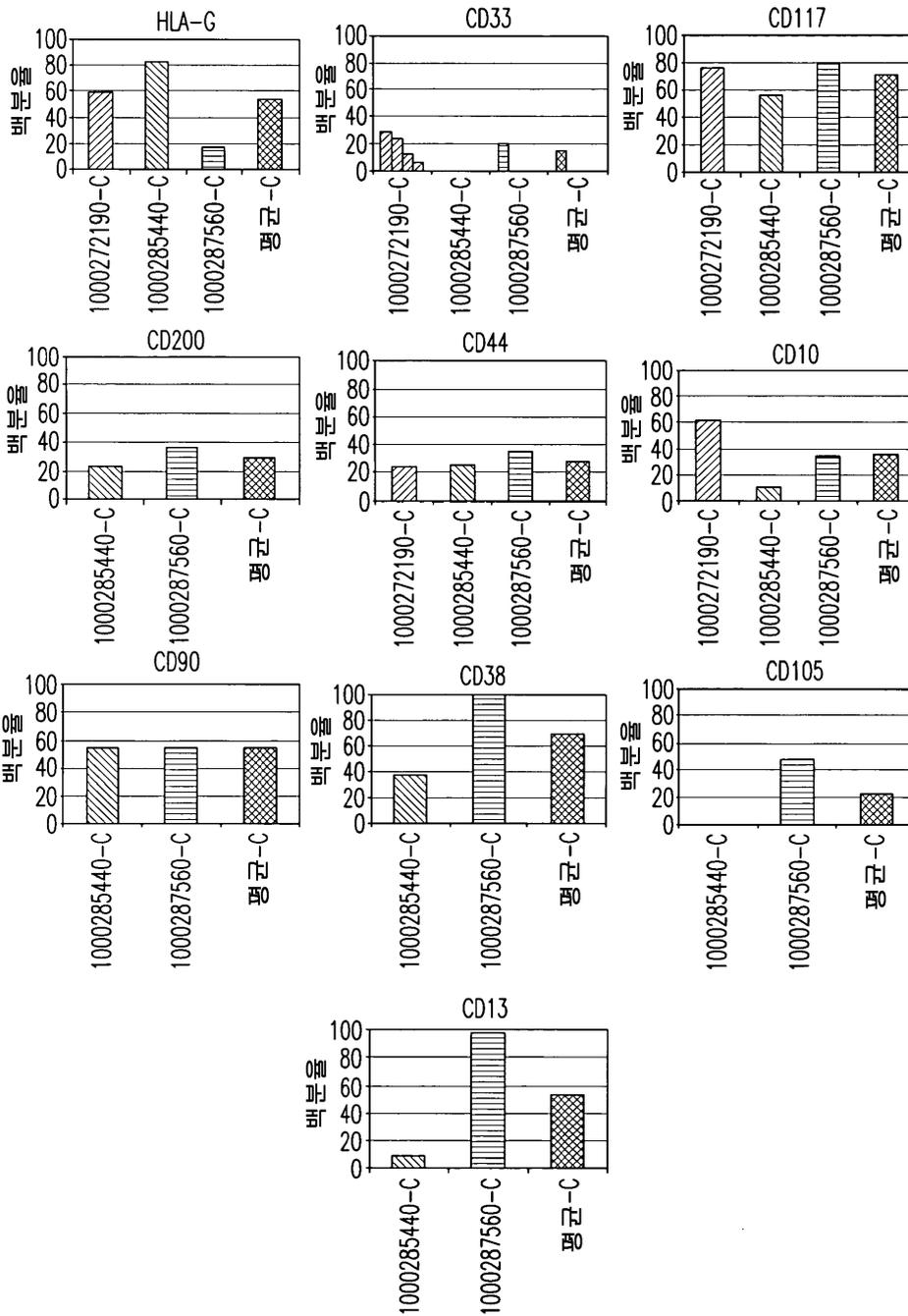
도면4



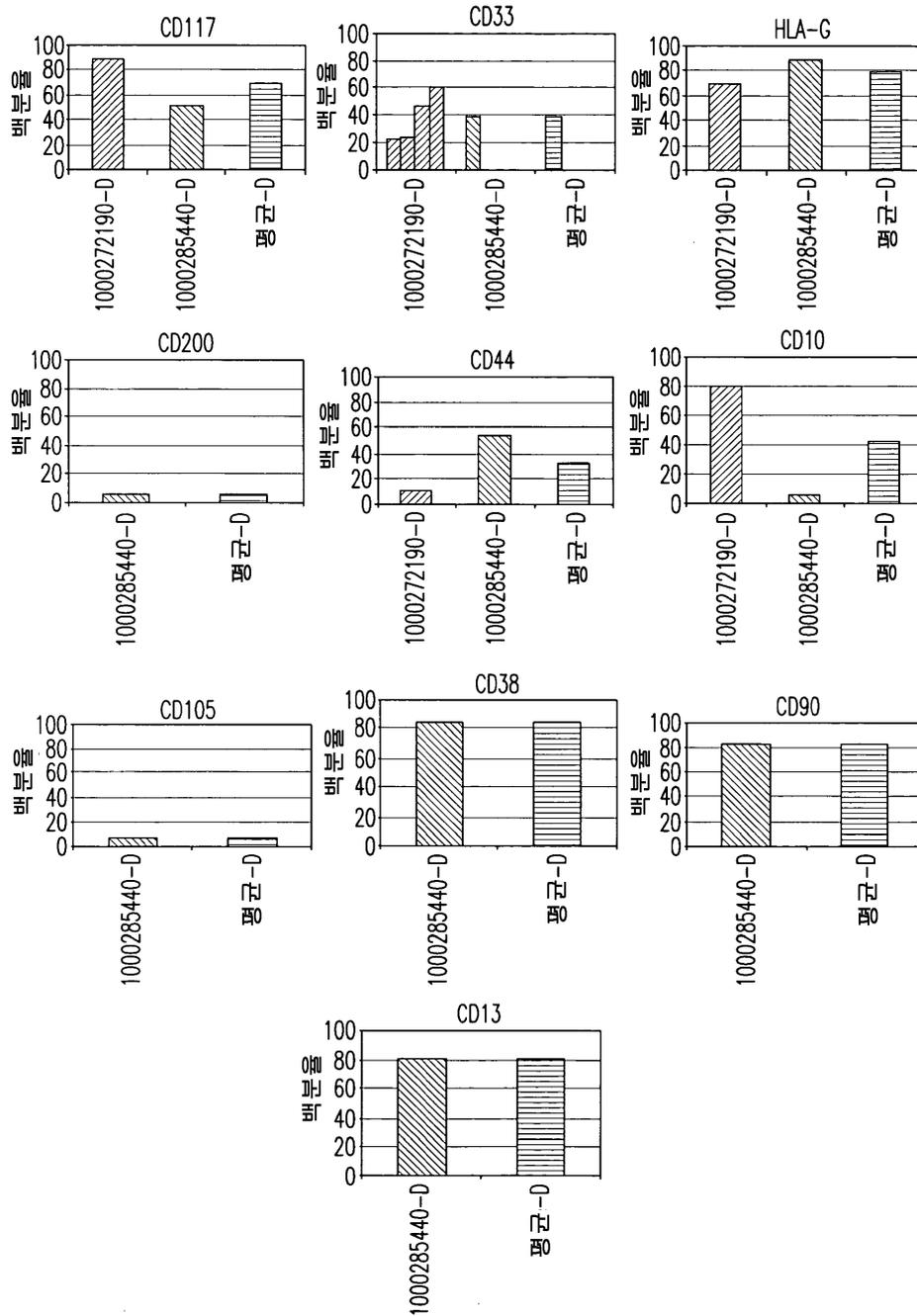
도면5



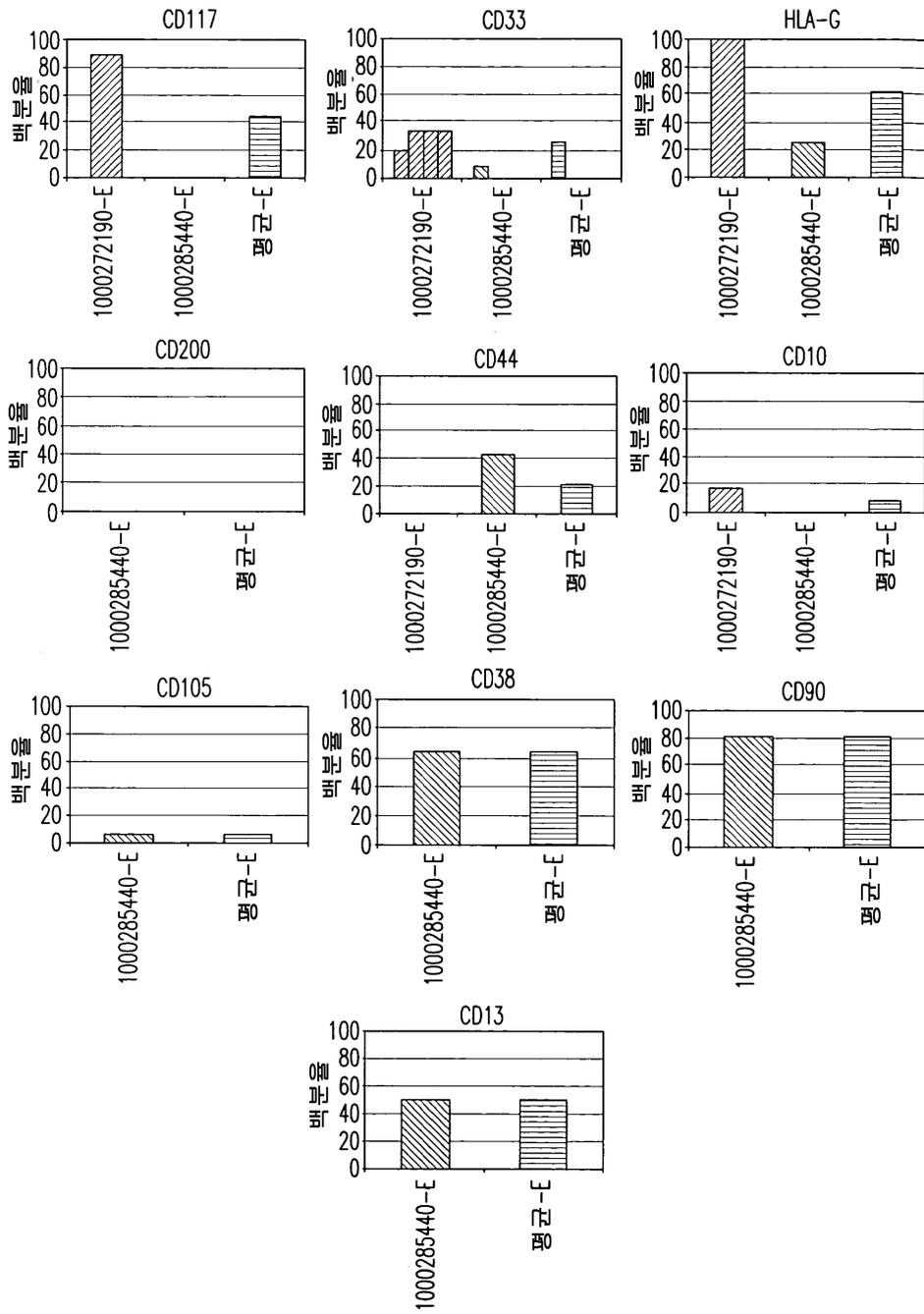
도면6



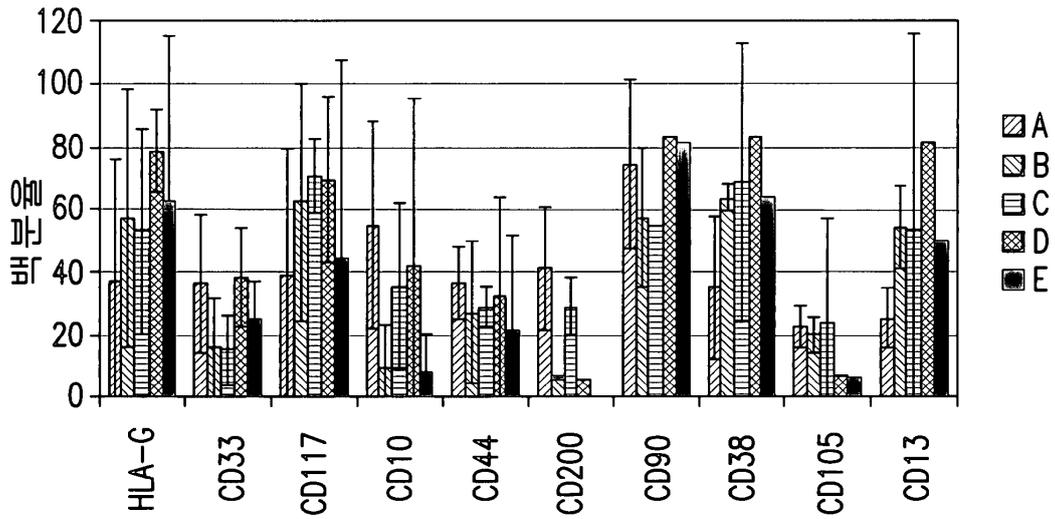
도면7



도면8



도면9



도면10

