



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월26일
(11) 등록번호 10-1993254
(24) 등록일자 2019년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/073 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/50 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7029076
(22) 출원일자(국제) 2011년04월06일
심사청구일자 2016년03월15일
(85) 번역문제출일자 2012년11월06일
(65) 공개번호 10-2013-0100053
(43) 공개일자 2013년09월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/031335
(87) 국제공개번호 WO 2011/127117
국제공개일자 2011년10월13일
(30) 우선권주장
61/321,822 2010년04월07일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02010021715 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
안트로제네시스 코퍼레이션
미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
(72) 발명자
애봇, 스튜어트
미국 07059 뉴저지주 워렌 카셀 드라이브 15
에딩거, 제임스
미국 07718 뉴저지주 벨포드 레오날드빌 로드 273
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 25 항

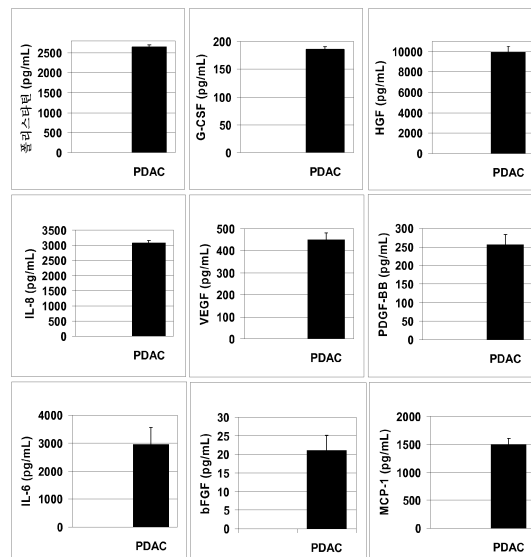
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 태반 줄기 세포를 사용한 혈관신생

(57) 요약

태반 세포, 예를 들어 본원에 기재된 태반 줄기 세포 및 태반 다능 세포 (PDAC), 및 상기 태반 세포 집단을 사용하여 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 본 발명은 또한 상기 세포 또는 상기 세포를 포함하는 세포 집단을 사용하는 혈관신생 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

프랭키, 알렉산더

미국 08801 뉴저지주 아난테일 라 코스타 드라이브 80

하리리, 로버트, 제이.

미국 07924 뉴저지주 버나즈빌 멘드햄 로드 341

얀코비치, 블라디미르

미국 10044 뉴욕주 뉴욕 리버 로드 30 아파트먼트 4디

카플루노프스키, 알렉산드르

미국 07828 뉴저지주 버드 레이크 클리어센 애비뉴 30

라바조, 크리스텐

미국 07081 뉴저지주 스프링필드 뉴브룩 레인 50

로우, 에릭

미국 08816 뉴저지주 이스트 브런즈윅 저니 드라이브 45

패드리야, 니라브

미국 07076 뉴저지주 스캇치 플레인즈 컨트리 클럽 레인 212

파레데스, 제니퍼

미국 07003 뉴저지주 블룸필드 이스트 파사익 애비뉴 363

왕, 지아-런

미국 08003 뉴저지주 체리 힐 래빗 런 로드 212

명세서

청구범위

청구항 1

유동 세포측정법에 의해 결정시 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 인 태반 유래 부착 세포의 집단을 포함하는, 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체를 치료하기 위한 제약 조성물로서,

상기 세포의 집단을, 상기 개체에서 상기 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선에 충분한 양으로 포함하는 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 순환계의 질환 또는 장애가 말초 혈관 질환, 말초 동맥 질환, 당뇨병성 궤양 및 중증 하지 허혈로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 순환계의 질환 또는 장애가 말초 혈관 질환인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 순환계의 질환 또는 장애가 말초 동맥 질환인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 순환계의 질환 또는 장애가 당뇨병성 궤양인 제약 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 순환계의 질환 또는 장애가 중증 하지 허혈인 제약 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 말초 혈관 질환의 증상이, 매달릴 때 붉게 변하는 시리고 저린 발, 통증, 또는 다리의 약화 및 피로인 제약 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 중증 하지 허혈의 증상이, 허혈성 안정시 통증, 개체가 움직이지 않는 동안 다리 및 발의 중증 통증, 발 또는 다리 상의 비-치유성 상처, 발의 통증 또는 무감각, 다리 또는 발의 번질번질하고 평탄하고 건조한 피부, 발톱의 비후화, 다리 또는 발의 맥박의 부재 또는 감소, 개방형 상처, 치유되지 않는 피부 감염 또는 궤양, 또는 다리 또는 발의 건성 괴저인 제약 조성물.

청구항 9

유동 세포측정법에 의해 결정시 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 인 태반 유래 부착 세포의 집단을 포함하는, 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체를 치료하기 위한 제약 조성물로서,

상기 세포의 집단을, 상기 태반 유래 부착 세포 투여 전의 개체에 비해 상기 개체에서 심장 기능의 하나 이상의 징후의 검출가능한 개선에 충분한 양으로 포함하며,

여기서 상기 심장 기능의 징후는 흉부 심장 박출량 (CO), 심장 지수 (CI), 폐동맥 췌기압 (PAWP), % 분획 단축 (%FS), 박출 계수 (EF), 좌심실 박출 계수 (LVEF), 좌심실 이완말기 직경 (LVEDD), 좌심실 수축말기 직경 (LVESD), 수축성 (dP/dt), 심방 또는 심실 기능의 감소, 펌핑 효율의 증가, 펌핑 효율 손실 속도의 감소, 혈류학적 기능 손실의 감소, 또는 심근병증 증상의 감소인 제약 조성물.

청구항 10

유동 세포측정법에 의해 결정시 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$ 및 $CD200^+$ 인 태반 유래 부착 세포를 치료 유효량으로 포함하는, 사지 내의 또는 사지 주변의 혈류의 파괴를 갖는 개체를 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 사지 내의 또는 사지 주변의 혈류의 파괴가 말초 동맥 질환, 중증 하지 허혈 또는 말초 혈관 질환에 의해 유발되는 것인 제약 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 사지 내의 또는 사지 주변의 혈류의 파괴가 말초 혈관 질환에 의해 유발되는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서, 사지 내의 또는 사지 주변의 혈류의 파괴가 말초 동맥 질환에 의해 유발되는 것인 제약 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 사지 내의 또는 사지 주변의 혈류의 파괴가 중증 하지 허혈에 의해 유발되는 것인 제약 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 태반 유래 부착 세포가 유동 세포측정법에 의해 검출가능시 추가로 $CD45^-$ 또는 $CD90^+$ 중 하나 이상인 것인 제약 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 태반 유래 부착 세포가 RT-PCR에 의해 검출시 추가로 OCT-4⁺인 것인 제약 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 태반 유래 부착 세포 조성물이 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내 또는 피하로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내 또는 피하로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내 또는 피하로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 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 또는 1×10^{10} 개의 태반 유래 부착 세포를 포함하는 제약 조성물.

청구항 21

제15항에 있어서, 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 또는 1×10^{10} 개의 태반 유래 부착 세포를 포함하는 제약 조성물.

청구항 22

제16항에 있어서, 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 또는 1×10^{10} 개의 태반 유래 부착 세포를 포함하는 제약 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 태반 유래 부착 세포가 상기 개체에게 투여되기 전에 적어도 1회 계대배양된 것인 제약 조성물.

청구항 24

제15항에 있어서, 태반 유래 부착 세포가 상기 개체에게 투여되기 전에 적어도 1회 계대배양된 것인 제약 조성물.

청구항 25

제16항에 있어서, 태반 유래 부착 세포가 상기 개체에게 투여되기 전에 적어도 1회 계대배양된 것인 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 1. 분야

[0002] 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 (본원에서 PDAC로 지칭됨)를 사용하여 혈관신생을 촉진하고, 순환계의 질환 또는 장애, 예를 들어 부적절한 혈관형성 또는 혈류와 관련된 또는 그로부터 유래된 질환 또는 장애, 또는 혈관신생을 향상시키는 것에 의해 치료가능한 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

배경 기술

[0003] 2. 배경

[0004] 태반은 줄기 세포의 특히 매력적 공급원이다. 포유동물 태반은 풍부하고, 정상적으로 의료 폐기물로서 처분되기 때문에, 이들은 의학적으로 유용한 줄기 세포의 유일한 공급원을 나타낸다. 이러한 단리된 태반 줄기 세포, 태반 줄기 세포의 집단, 및 이를 사용하여 혈관신생을 촉진하고 순환계의 질환 또는 장애, 예를 들어 혈관신생의 촉진에 의해 치료가능한 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

발명의 내용

[0005] 3. 개요

[0006] 한 측면에서, 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체에게 치료 유효량의 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 (또한 본원에서 PDAC로 지칭됨) (태반 유래 부착 세포, 예를 들어 하기 섹션 5.2에 기재된 태반-유래 부착 세포)를 상기 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선에 충분한 양으로 및 그에 충분한 시간 동안 투여하는 것을 포함하는, 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체에서의 치료 방법이 본원에 제공된다. 그러나, 본원에 기재된 PDAC는 2009년 11월 19일자로 출원된 발명의 명칭 "양막 유래 혈관형성 세포(Amion Derived Angiogenic Cells)"의 계류 중인 미국 특허 출원 번호 12/622,352 (그 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 양막 유래 부착 세포가 아니다. 특정 실시양태에서, 방법은 개체에게 PDAC를, 상기 PDAC의 투여 전의 개체에 비해 흉부 심장 박출량 (CO), 심장 지수 (CI), 폐동맥 췌기압 (PAWP), 심장 지수 (CI), % 분획 단축 (%FS), 박출 계수 (EF), 좌심실 박출 계수 (LVEF); 좌심실 이완말기 직경 (LVEDD), 좌심실 수축말기 직경 (LVESD), 수축성 (dP/dt), 심방 또는 심실 기능의 감소, 펌핑 효율의 증가, 펌핑 효율 손실 속도의 감소, 혈류학적 기능 손실의 감소, 또는 심근병증과 관련된 합병증의 감소인 심장 기능의

하나 이상의 징후의 검출가능한 개선에 충분한 양으로 및 그에 충분한 시간 동안 투여하는 것을 포함한다.

[0007] 다른 실시양태에서, 상기 순환계의 질환 또는 장애는 심근경색이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 질환 또는 장애는 심근병증이다. 다른 실시양태에서, 상기 질환 또는 장애는 동맥류, 협심증, 대동맥 협착, 대동맥염, 부정맥, 동맥경화증, 동맥염, 비대칭 중벽 비대증 (ASH), 아테롬성동맥경화증, 심방 세동 및 조동, 박테리아성 심내막염, 바르로우(Barlow) 증후군 (승모판 탈출증), 서맥, 버거병 (폐쇄성 혈전혈관염), 심장비대, 심장염, 경동맥 질환, 대동맥의 축착, 선천성 심장 결손, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 아이젠메거 증후군, 색전증, 심내막염, 피부홍통증, 세동, 섬유근성 이형성증, 심장 차단, 심장 잡음, 고혈압, 저혈압, 특발성 영아 동맥 석회화, 가와사키병 (점막피부성 림프절 증후군, 점막피부성 림프절 질환, 영아 다발성동맥염), 대사 증후군, 미세혈관 협심증, 심근염, 발작성 심방성 빈맥 (PAT), 결절성 동맥주위염 (다발성동맥염, 결절성 다발성동맥염), 심막염, 말초 혈관 질환, 위독기 사지 허혈, 정맥염, 폐동맥관 협착 (폐 협착), 레이노병, 신동맥 협착, 신혈관성 고혈압, 류마티스성 심질환, 당뇨병성 혈관병증, 중격 결손, 무증상성 허혈, 증후군 X, 빈맥, 다카야스 동맥염, 팔로 사징증, 대혈관 전위증, 삼첨판 폐쇄증, 동맥 줄기, 판막성 심장 질환, 정맥류성 궤양, 정맥류, 혈관염, 심실 중격 결손, 볼프-파킨슨-화이트 증후군, 심내막 용기 결손, 급성 류마티스성 열, 급성 류마티스성 심낭염, 급성 류마티스성 심내막염, 급성 류마티스성 심근염, 만성 류마티스성 심질환, 승모판 질환, 승모판 협착, 류마티스성 승모판 폐쇄부전, 대동맥관 질환, 다른 심내막 구조의 질환, 허혈성 심장 질환 (급성 및 아급성), 가슴조임증, 급성 폐 심장 질환, 폐 색전증, 만성 폐 심장 질환, 척추후측만곡성 심장 질환, 심근염, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 심내막 섬유탄성증, 방실 차단, 심장 리듬장애, 심근 변성, 뇌혈관 질환, 동맥, 세동맥 및 모세혈관의 질환, 또는 정맥 및 림프관의 질환이다.

[0008] 다른 구체적 실시양태에서, 상기 질환 또는 장애는 뇌전 동맥의 폐쇄 및 협착, 또는 뇌동맥의 폐쇄이다. 한 측면에서, 개체의 뇌 내의 또는 주변의 혈류의 파괴를 갖는 개체, 예를 들어 개체의 뇌 또는 중추 신경계 (CNS) 내의 또는 주변의 혈류의 파괴에 기인하는 증상 또는 신경학적 결핍을 갖는 개체에게 치료 유효량의 단리된 태반 줄기 세포 (예를 들어, PDAC)를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 혈류의 파괴는 개체의 뇌 또는 CNS에 무산소 손상 또는 저산소 손상을 일으킨다.

[0009] 다른 구체적 실시양태에서, 상기 질환 또는 장애는 말초 동맥의 폐쇄 및 협착이다. 한 측면에서, 사지 내의 또는 주변의 혈류의 파괴가 있는 개체, 예를 들어 개체의 말초혈관계 내의 또는 주변의 혈류의 파괴에 기인하는 증상 또는 혈관 결손이 있는 개체에게 치료 유효량의 단리된 PDAC를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 혈류의 파괴는 개체의 사지 및/또는 팔다리에 무산소 손상 또는 저산소 손상을 일으킨다.

[0010] 치료 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 주사에 의해 상기 개체에게 투여된다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 주사는 개체의 심장의 허혈 영역 내로의 주사이다. 치료 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 정맥내 주입에 의해 상기 개체에게 투여된다. 치료 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포, 또는 상기 세포의 집단, 또는 상기 세포를 포함하는 세포의 집단은 상기 기재된 바와 같은 태반 유래 부착 세포를 포함하는 매트릭스 또는 스캐폴드를 상기 개체에 삽입함으로써 상기 개체에게 투여된다.

[0011] 특정 실시양태에서, 상기 태반 세포는 상기 개체에게 정맥내로 투여된다. 다른 실시양태에서, 치료 방법은 적어도 약 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 또는 1×10^{10} 개의 태반 세포를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 상기 태반 세포는 시험관 내에서 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50 집단 배가까지 증식한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20회 또는 그 초과로 계대배양된 상기 세포의 배양물로부터의 것이다. 본원의 임의의 실시양태의 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 동결보존되고 상기 투여에 앞서 해동된다.

[0012] 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 동결보존되고 상기 접촉 전에 해동된다.

[0013] 임의의 상기 방법의 특정 실시양태에서, 상기 태반 세포는 조직 배양 플라스틱에 부착성이고, 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 및 $CD200^+$ 이다. 특정 실시양태에서, 태반 세포는 골형성 또는 연골형성 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 조직 배양 플라스틱에 부착성이고; 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 및 $CD200^+$ 이고; 골형성 또는 연골형성 세포의 하나

이상의 특성, 예를 들어 골세포 또는 연골세포의 특성을 갖는 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는다. 다른 실시양태에서, 태반 세포는 추가로 신경 세포 또는 신경원성 세포의 하나 이상의 특성, 예를 들어 뉴런의 특성; 신경교 세포의 하나 이상 특성, 예를 들어 신경교 또는 성상세포의 특성; 지방세포성 세포의 하나 이상 특성, 예를 들어 지방세포의 특성; 췌장 세포의 하나 이상 특성; 및/또는 심장 세포의 하나 이상 특성을 갖는 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는다.

[0014] 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법 및/또는 RT-PCR에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$, 및 $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD133^{-}$, HLA-DR, DP, DQ $^{-}$, SSEA3 $^{-}$, SSEA4 $^{-}$, $CD29^{+}$, $CD44^{+}$, $CD73^{+}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$, HLA-A, B, C $^{+}$, PDL1 $^{+}$, ABC-p $^{+}$ 및/또는 OCT-4 $^{+}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD45^{-}$, $CD10^{+}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD45^{-}$, $CD10^{+}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD45^{-}$, $CD10^{+}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$, 및 추가로 $CD29^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD54^{+}$, SH3 $^{+}$ 또는 SH4 $^{+}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD10^{+}$, $CD29^{+}$, $CD44^{+}$, $CD54^{+}$, $CD73^{+}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 이다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 상기 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD117^{-}$, $CD133^{-}$, KDR $^{-}$ (VEGFR2 $^{-}$), HLA-A, B, C $^{+}$, HLA-DP, DQ, DR $^{-}$, 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 (PDL1) $^{+}$ 중 하나 이상, 또는 그의 임의의 조합이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD10^{+}$, $CD29^{+}$, $CD44^{+}$, $CD54^{+}$, $CD73^{+}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$, $CD117^{-}$, $CD133^{-}$, $CD200^{+}$, KDR $^{-}$ (VEGFR2 $^{-}$), HLA-A, B, C $^{+}$, HLA-DP, DQ, DR $^{-}$, 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 (PDL1) $^{+}$ 이다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출시 ABC-p $^{+}$, 또는 예를 들어 RT-PCR에 의해 결정시 OCT-4 $^{+}$ (POU5F1 $^{+}$)이고, 여기서 ABC-p는 태반-특이적 ABC 수송체 단백질 (유방암 내성 단백질 (BCRP)로서 및 미토산트론 내성 단백질 (MXR)로서도 공지됨)이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로, 예를 들어 유동 세포측정법에 의해 결정시 SSEA3 $^{-}$ 또는 SSEA4 $^{-}$ 이고, 여기서 SSEA3은 단계 특이적 배아 항원 3이고, SSEA4는 단계 특이적 배아 항원 4이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로 SSEA3 $^{-}$ 및 SSEA4 $^{-}$ 이다.

[0017] 본원에 기재된 방법의 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로 MHC-I $^{+}$ (예를 들어, HLA-A, B, C $^{+}$), MHC-II $^{-}$ (예를 들어, HLA-DP, DQ, DR $^{-}$) 또는 HLA-G $^{-}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로 각각 MHC-I $^{+}$ (예를 들어, HLA-A, B, C $^{+}$), MHC-II $^{-}$ (예를 들어, HLA-DP, DQ, DR $^{-}$) 및 HLA-G $^{-}$ 이다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 세포는 추가로 $CD29^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD54^{+}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, SH3 $^{+}$ 또는 SH4 $^{+}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD44^{+}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD13^{+}$, $CD29^{+}$, $CD33^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD45^{-}$, $CD54^{+}$, $CD62E^{-}$, $CD62L^{-}$, $CD62P^{-}$, SH3 $^{+}$ ($CD73^{+}$), SH4 $^{+}$ ($CD73^{+}$), $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, SH2 $^{+}$ ($CD105^{+}$), $CD106/VCAM^{+}$, $CD117^{-}$, $CD144/VE-카드헤린^{+}$, $CD184/CXCR4^{-}$, $CD133^{-}$, OCT-4 $^{+}$, SSEA3 $^{-}$, SSEA4 $^{-}$, ABC-p $^{+}$, KDR $^{-}$ (VEGFR2 $^{-}$), HLA-A, B, C $^{+}$, HLA-DP, DQ, DR $^{-}$, HLA-G $^{-}$ 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 (PDL1) $^{+}$ 중 하나 이상, 또는 그의 임의의 조합이다. 또 다른 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD13^{+}$, $CD29^{+}$, $CD33^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD45^{-}$, $CD54/ICAM^{+}$, $CD62E^{-}$, $CD62L^{-}$, $CD62P^{-}$, SH3 $^{+}$ ($CD73^{+}$), SH4 $^{+}$ ($CD73^{+}$), $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, SH2 $^{+}$ ($CD105^{+}$),

CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-카드헤린^약, CD184/CXCR4⁻, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, 및 프로그램화된 사멸-1 리간드 (PDL1)⁺이다.

[0019] 본원에 개시된 방법의 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD200⁺ 및 HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺; CD200⁺ 및 OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻; CD73⁺ 및 CD105⁺; 또는 OCT-4⁺; 또는 그의 임의의 조합이다.

[0020] 본원에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, MHC-I⁺ 또는 ABC-p⁺ 중 하나 이상이고, 여기서 ABC-p는 태반-특이적 ABC 수송체 단백질 (유방암 내성 단백질 (BCRP) 및 미톡산트론 내성 단백질 (MXR)로서도 공지됨)이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, 및 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, MHC-1⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 OCT-4⁺ 및 ABC-p⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이다. 구체적 실시양태에서, 상기 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻ 세포는 추가로 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, 및 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻, 및 SH3⁺ 또는 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD34⁻, 및 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺ 또는 OCT-4⁺이다. 특정 실시양태에서, 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ 및 CD200⁺이다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 유용한 단리된 태반 줄기 세포는 CD10⁺, CD29⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁻, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린^약, CD184/CXCR4⁻, β2-마이크로글로불린^약, MHC-I^약, MHC-II⁻, HLA-G^약, 및/또는 PDL1^약 중 하나 이상이다. 특정 실시양태에서, 이러한 태반 세포는 적어도 CD29⁻ 및 CD54⁻이다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 단리된 태반 줄기 세포는 적어도 CD44⁺ 및 CD106⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 단리된 태반 줄기 세포는 적어도 CD29⁺이다.

[0022] 임의의 상기 특성의 특정 실시양태에서, 세포 마커 (예를 들어, 분화 집단 또는 면역원성 마커)의 발현은 유동 세포측정법에 의해 결정한다. 다른 특정 실시양태에서, 세포 마커의 발현은 RT-PCR에 의해 결정한다.

[0023] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 유용한 상기 태반 세포, 예를 들어 상기 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 세포는 하나 이상의 유전자를 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하고, 여기서 상기 하나 이상의 유전자는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A 중 하나 이상이고, 상기 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 상기 단리된 태반 줄기 세포가 겪은 계대배양의 횟수와 동일한 수의 계대배양을 배양시에 겪었다. 특정 실시양태에서, 상기 하나 이상의 유전자의 상기 발현은 예를 들어 RT-PCR 또는 예를 들어 U133-A 마이크로어레이 (아피메트릭스(Affymetrix))를 사용한 마이크로어레이 분석에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 태반 줄기 세포는 60% DMEM-LG (예를 들어, 기코(Gibco)로부터) 및 40% MCDB-201 (예를 들어, 시그마(Sigma)로부터); 2% 태아 소 혈청 (예를 들어, 하이클론 랩스.(Hyclone Labs.)로부터);

1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1x 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10^{-9} M 텍사메타손 (예를 들어, 시그마로부터); 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (예를 들어, 시그마로부터); 표피 성장 인자 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈(R&D Systems)로부터); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터)를 포함하는 배지 중에서, 예를 들어 약 3 내지 약 35 집단 배가 중 임의의 시점 동안 배양될 때, 상기 하나 이상의 유전자를 발현한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 태반 줄기 세포는 60% DMEM-LG (예를 들어, 김코로부터) 및 40% MCDB-201 (예를 들어, 시그마로부터); 2% 태아 소 혈청 (예를 들어, 하이클론 랩스.로부터); 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1x 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10^{-9} M 텍사메타손 (예를 들어, 시그마로부터); 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (시그마); 표피 성장 인자 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터)를 포함하는 배지 중에서 약 3 내지 약 35 집단 배가 동안 배양될 때, 상기 하나 이상의 유전자를 발현한다.

[0024] 특정 실시양태에서, 태반 세포는 CD200 및 ARTS1 (유형 1 종양 괴사 인자의 아미노펩티다제 조절제); ARTS-1 및 LRAP (백혈구-유래 아르기닌 아미노펩티다제); IL6 (인터류킨-6) 및 TGFβ2 (형질전환 성장 인자, 베타 2); IL6 및 KRT18 (케라틴 18); IER3 (극초기 반응 3), MEST (중배엽 특이적 전사체 상동체) 및 TGFβ2; CD200 및 IER3; CD200 및 IL6; CD200 및 KRT18; CD200 및 LRAP; CD200 및 MEST; CD200 및 NFE2L3 (핵 인자 (적혈구-유래 2)-유사 3); 또는 CD200 및 TGFβ2를 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BM-MSC)보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하고, 여기서 상기 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 상기 태반 줄기 세포가 겪은 계대배양의 횟수와 동일한 수의 계대배양을 배양시에 겪었다. 다른 실시양태에서, 태반 세포는 ARTS-1, CD200, IL6 및 LRAP; ARTS-1, IL6, TGFβ2, IER3, KRT18 및 MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 및 TGFβ2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3 및 TGFβ2; 또는 IER3, MEST 및 TGFβ2를 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포 BM-MSC보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하고, 여기서 상기 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 상기 태반 줄기 세포가 겪은 계대배양의 횟수와 동일한 수의 계대배양을 배양시에 겪었다.

[0025] 인간 세포가 사용될 때, 전반에 걸쳐 유전자 명칭은 인간 서열을 지칭하고, 당업자에게 널리 공지된 바와 같이 대표적인 서열은 문헌 또는 진뱅크에서 찾아볼 수 있다. 서열에 대한 프로브는 공격적으로 이용가능한 서열에 의해 또는 상업적 공급원을 통해, 예를 들어 특이적 택맨(TAQMAN)® 프로브 또는 택맨® 혈관신생 어레이 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 파트 번호 4378710)를 통해 결정될 수 있다.

[0026] 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 유용한 상기 단리된 태반 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 세포의 집단 내에 상기 단리된 태반 세포인 세포를 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 함유한다. 다른 특정 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중의 태반 세포는 모체 유전자형을 갖는 세포를 실질적으로 함유하지 않으며, 예를 들어 상기 집단 중 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 태반 세포가 태아 유전자형을 가지며, 즉 태아 기원이다. 다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 세포를 포함하는 세포의 집단은 모체 유전자형을 갖는 세포를 실질적으로 함유하지 않으며, 예를 들어 상기 집단 중 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 세포가 태아 유전자형을 가지며, 즉 태아 기원이다. 다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 세포를 포함하는 세포의 집단은 모체 유전자형을 갖는 세포를 포함하고; 예를 들어, 상기 집단 내의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 세포는 모체 유전자형을 가지고, 즉 모체 기원이다.

[0027] 본원의 태반 세포 (예를 들어, PDAC)의 임의의 실시양태의 실시양태에서, 태반 세포는 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때, 예를 들어 증식 조건 하에 배양될 때 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단 내에서의 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다.

[0028] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 유용한 태반 세포 (예를 들어, PDAC)는 1 내지 100 ng/mL VEGF에 4 내지 21일 동안 노출된 후 면역학적 위치 결정에 의해 검출시 CD34를 발현하지 않는다. 구체적 실시양태에서, 상기 태반 부착 세포는 조직 배양 플라스틱에 부착성이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 집단은, 예를 들어 매트릭겔(MATRIGEL)™과 같은 기재 상에서 혈관신생 인자, 예컨대 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 상피 성장 인자 (EGF), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 또는 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)의 존재 하에 배양될 때 싹 또는 관-유사 구조를 형성한다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 PDAC, 세포 집단, 예를 들어 PDAC의 집단, 또는 상기 단리된 세포 집단 내의

세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98%가 PDAC인 세포 집단은 VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, 폴리스타틴, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR 또는 갈락틴-1 중 하나 이상 또는 전부를, 예를 들어 세포 또는 세포들이 성장하는 배양 배지 내로 분비한다. 또 다른 실시양태에서, 또 다른 실시양태에서, PDAC는 정상산소 조건 (예를 들어, 약 20% 또는 약 21% O₂)과 비교하여 저산소 조건 (예를 들어, 약 5% O₂ 미만) 하에 CD202b, IL-8 및/또는 VEGF의 증가된 수준을 나타낸다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 PDAC 또는 PDAC를 포함하는 세포 집단은 상기 태반 유래 부착 세포와 접촉하는 내피 세포의 집단에서 싹 또는 관-유사 구조의 형성을 일으킬 수 있다. 구체적 실시양태에서, 태반-유래 혈관신생 세포는 인간 내피 세포와 공동-배양되어, 예를 들어 태반 콜라겐 또는 매트릭셀™과 같은 기재 내에서 또는 상에서 적어도 4일 동안 세포의 매트릭스 단백질, 예컨대 콜라겐 유형 I 및 IV, 및/또는 혈관신생 인자, 예컨대 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 상피 성장 인자 (EGF), 혈소관 유래 성장 인자 (PDGF) 또는 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)의 존재 하에 배양될 때 싹 또는 관-유사 구조를 형성하거나 내피 세포 발아를 지지한다.

[0031] 본원에 개시된 임의의 태반 세포의 특정 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다.

[0032] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 수용자에 대해 자가유래의 것이다. 다른 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 수용자에 대해 이종유래의 것이다.

[0033] 특정 실시양태에서, 태반 세포는 상기 투여 전에 동결보존된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태반 세포 은행 (예를 들어, PDAC 은행)으로부터 입수한다.

[0034] 단리된 태반 세포의 임의의 상기 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 일반적으로 성장 배지, 즉, 증식을 촉진시키도록 제조된 배지에서 배양하는 동안, 예를 들어 성장 배지에서 증식하는 동안 분화되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 증식하기 위해 피더 층을 필요로 하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포를 단지 피더 세포 층의 부재하에 배양한 결과, 이는 배양물 중에서 분화되지 않는다.

[0035] 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 혈액이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류되었거나; 혈액이 배출되었지만 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지는 않았거나; 또는 혈액이 배출되거나 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지 않은 산후 태반의 관류에 의해 수득하였다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태반 조직의 물리적 및/또는 효소에 의한 파괴에 의해 수득하였다.

[0036] 본원에 제공된 방법에 유용한, 태반 세포의 세포 표면 마커, 분자 마커 및 유전자 마커가 하기 섹션 5.2에 상세하게 기재되어 있다.

[0037] 상기 기재된 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 블루스 주사에 의해 투여된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 구체적 실시양태에서, 상기 정맥내 주입은 약 1 내지 약 8시간에 걸친 정맥내 주입이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 두개내 투여된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 복강내 투여된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 동맥내 투여된다. 치료 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 근육내, 피내, 피하, 경막내 또는 안내 투여된다.

[0038] 상기 기재된 방법의 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 물질의 조성물을 상기 개체 내로 수술에 의해 이식함으로써 상기 단리된 태반 세포가 투여된다. 구체적 실시양태에서, 상기 물질의 조성물은 매트릭스 또는 스캐폴드이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스 또는 스캐폴드는 히드로겔이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스 또는 스캐폴드는 탈세포화된 조직이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스 또는 스캐폴드는 합성 생분해성 조성물이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스 또는 스캐폴드는 발포체이다.

[0039] 상기 기재된 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 상기 개체에게 1회 투여된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 상기 개체에게 2회 이상의 개별 투여로 투여된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체 1 kg 당 약 1×10^4 내지 1×10^5 개의 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체 1 kg 당 약 1×10^5 내지 1×10^6 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투

여는 상기 개체 1 kg당 약 1×10^6 내지 1×10^7 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체 1 kg당 약 1×10^7 내지 1×10^8 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체 1 kg당 약 1×10^6 내지 약 2×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 2×10^6 내지 약 3×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 3×10^6 내지 약 4×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 4×10^6 내지 약 5×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 5×10^6 내지 약 6×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 6×10^6 내지 약 7×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 7×10^6 내지 약 8×10^6 개의 단리된 태반 세포; 상기 개체 1 kg당 약 8×10^6 내지 약 9×10^6 개의 단리된 태반 세포; 또는 상기 개체 1 kg당 약 9×10^6 내지 약 1×10^7 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 상기 개체 1 kg당 약 1×10^7 내지 약 2×10^7 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 상기 개체 1 kg당 약 1.3×10^7 내지 약 1.5×10^7 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 상기 개체 1 kg당 약 3×10^7 개까지의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 약 20 밀리리터 용액 내의 약 150×10^6 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함한다.

[0040] 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 약 5×10^6 내지 약 2×10^7 개의 단리된 태반 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 세포는 10% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란-40, 5% 인간 혈청 알부민, 및 임의로 면역억제제를 포함하는 용액 내에 함유된다.

[0041] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 약 5×10^7 내지 3×10^9 개의 단리된 태반 세포를 정맥내 투여하는 것을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 약 9×10^8 개의 단리된 태반 세포 또는 약 1.8×10^9 개의 단리된 태반 세포를 정맥내 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 약 5×10^7 개 내지 1×10^8 개의 단리된 태반 세포를 병변내로 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 투여는 약 9×10^7 개의 단리된 태반 세포를 병변내로 투여하는 것을 포함한다.

[0042] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 사용된 태반 세포는 혈관신생을 촉진하는 하나 이상의 단백질의 생성을 위해 유전적으로 조작될 수 있다. 특정 실시양태에서, 혈관신생을 촉진하는 상기 단백질은 간세포 성장 인자 (HGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) (예를 들어, VEGFD), 섬유모세포 성장 인자 (FGF) (예를 들어, FGF2), 안지오텐신 (ANG), 표피 성장 인자 (EGF), 상피-호중구-활성화 단백질 78 (ENA-78), 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 성장-조절 종양유전자 단백질 (GRO), 인터류킨-6 (IL-6), IL-8, 랩틴, 단백질 화학주성 단백질-1 (MCP-1), MCP-3, 혈소판-유래 성장 인자 서브유닛 B (PDGFB), 란테스(rantes), 형질전환 성장 인자 베타 1 (TGF- β 1), 트롬보포이에틴 (Tpo), 메탈로프로테이나제 1 (TIMP1), TIMP2의 조직 억제제, 및/또는 우로키나제 플라스미노겐 활성화제 수용체 (uPAR) 중 하나 이상이다.

[0043] 3.1 정의

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 언급된 수치에 대해 사용될 때, 언급된 수치의 $\pm 10\%$ 내의 값을 나타낸다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, 본원에 기재된 태반 유래 부착 세포에 대한 용어 "혈관신생성"은 세포가 혈관 또는 혈관-유사 발아를 형성할 수 있거나, 또는 세포가 또 다른 세포 집단, 예를 들어 내피 세포에서 혈관신생 (예를 들어, 혈관 또는 혈관-유사 구조의 형성)을 촉진할 수 있음을 의미한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "혈관신생"은 내피 세포 활성화, 이동, 증식, 매트릭스 재형성 및 세포 안정화를 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 혈관 형성 과정을 지칭한다.

- [0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유래된"은 그로부터 단리되거나 달리 정제된 것을 의미한다. 예를 들어, 태반 유래 부착 세포는 태반으로부터 단리된다. 용어 "유래된"은 조직, 예를 들어 태반으로부터 직접적으로 단리된 세포로부터 배양된 세포, 및 1차 분리주로부터 배양되거나 확장된 세포를 포함한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, "면역학적 위치 결정"은 예를 들어 유동 세포측정법, 형광-활성화 세포 분류, 자기 세포 분류, 계내 혼성화, 면역조직화학 등에서 면역 단백질, 예를 들어 항체 또는 그의 단편을 사용한 화합물, 예를 들어 세포 마커의 검출을 의미한다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "SH2"는 세포 마커 CD105 상의 에피토프에 결합하는 항체를 나타낸다. 따라서, SH2⁺로 지칭되는 세포는 CD105⁺이다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "SH3" 및 "SH4"는 세포 마커 CD73 상에 존재하는 에피토프에 결합하는 항체를 나타낸다. 따라서, SH3⁺ 및/또는 SH4⁺로 지칭되는 세포는 CD73⁺이다.
- [0051] 태반은 태반 내에서 발달하는 태아의 유전자형을 지니지만, 또한 임신 기간 동안 모체 조직과 물리적으로 가깝게 접촉된다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "태아 유전자형"은 태아의 유전자형, 예를 들어 태아를 임신한 모체의 유전자형과 대조적으로, 그로부터 본원에 기재된 특정 단리된 태반 줄기 세포를 얻는 태반과 연관된 태아의 유전자형을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "모체 유전자형"은 태아, 예를 들어 그로부터 본원에 기재된 특정 단리된 태반 줄기 세포를 얻는 태반과 연관된 태아를 임신한 모체의 유전자형을 의미한다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 세포", 예를 들어 "단리된 태반 세포", "단리된 태반 줄기 세포" 등은 줄기 세포가 유래되는 조직, 예를 들어 태반의 다른 상이한 세포로부터 실질적으로 분리된 세포를 의미한다. 예를 들어, 줄기 세포의 수집 및/또는 배양 동안, 줄기 세포와 자연적으로 회합되어 있는 세포, 예를 들어 비-줄기 세포, 또는 상이한 마커 프로파일을 나타내는 줄기 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가 줄기 세포로부터 제거되면, 세포가 "단리"된다.
- [0053] 본원에 사용된 바와 같이, 세포를 언급할 때 "다능"은 세포가 신체의 일부 유형 (모든 유형일 필요는 없음)의 세포로, 또는 신체의 일부 유형 (모든 유형일 필요는 없음)의 세포의 특성을 갖는 세포로, 또는 3개의 배엽층 중 하나 이상의 세포로 분화하는 능력을 가짐을 의미한다. 특정 실시양태에서, 예를 들어 신경원성, 연골형성 및/또는 골형성 세포의 특성을 갖는 세포로 분화하는 능력을 갖는, 하기 섹션 5.2에 기재된 바와 같은 단리된 태반 세포 (PDAC)는 다능 세포이다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 세포의 집단"은 그로부터 세포의 집단이 유래되는 조직, 예를 들어 태반의 다른 세포로부터 실질적으로 분리된 세포의 집단을 의미한다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "태반 세포"는 1차 배양 후 계대배양의 횟수와 무관하게 1차 분리주 또는 배양된 세포로서, 예를 들어 하기 섹션 5.2에 기재된 바와 같이 포유동물 태반으로부터 단리되거나, 또는 포유동물 태반으로부터 단리된 세포로부터 배양된 줄기 세포 또는 전구 세포 (본원에서 "PDAC"로도 지칭됨)를 지칭한다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "태반 세포" 및 본원에 제공된 방법에 사용된 태반 세포는 영양막, 세포영양막, 융합세포영양막, 혈관모세포, 혈관모세포, 배아 배세포, 배아 줄기 세포, 배반포의 속세포덩이로부터 수득된 세포, 또는 후기 배아의 생식선 용기로부터 수득된 세포, 예를 들어 배아 생식 세포를 지칭하지 않는다. 본원에 기재된 태반 세포, 예를 들어 PDAC는 2009년 11월 19일자로 출원된 발명의 명칭 "Amnion Derived Angiogenic Cells"의 계류 중인 미국 특허 출원 번호 12/622,352 (그 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 양막-유래 부착 세포가 아니다. 세포가 줄기 세포의 속성, 예를 들어 줄기 세포의 1가지 이상의 유형과 관련된 마커 또는 유전자 발현 프로파일; 배양에서 10-40회 이상 복제되는 능력, 및 3가지 배엽층 중 하나 이상의 분화된 세포의 특성을 나타내는 세포로 분화되는 능력을 나타내는 경우 세포가 "줄기 세포"로 간주된다. 본원에서 달리 표시되지 않으면, 용어 "태반"은 제대를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 단리된 태반 세포는 분화 조건 하에 시험관 내에서 분화되거나, 생체 내에서 분화되거나, 또는 양쪽 모두이다.
- [0056] 본원에 사용된 태반 세포는 마커가 배경을 초과하여 검출가능한 경우 이러한 특정 마커에 대해 "양성"이다. 특정 마커의 검출은 예를 들어 항체의 사용에 의해, 또는 마커를 코딩하는 유전자 또는 mRNA의 서열을 기초로 한 올리고뉴클레오타이드 프로브 또는 프라이머에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 태반 세포는 예를 들어 CD73에 대해 양성인데, 이는 CD73이 배경보다 (예를 들어, 이소형 대조군과 비교하여) 검출가능하게 큰 양으로 태반 세포 상에서 검출가능하기 때문이다. 마커가 세포를 하나 이상의 또 다른 세포 유형으로부터 구별하는데 사용될

수 있거나 또는 세포에 의해 발현되거나 존재하는 경우 세포를 선택 또는 분리하는데 사용될 수 있는 경우, 세포는 이러한 마커에 대해 또한 양성이다. 예를 들어, 항체-매개 검출의 문맥에서, 특정 세포 표면 마커의 존재를 표시하는 것으로서의 "양성"은 마커가 마커에 특이적인 항체, 예를 들어 형광-표지된 항체를 사용하여 검출 가능함을 의미하고; "양성"은 또한 예를 들어 세포측정기에서 배경을 검출가능하게 초과하는 신호를 생성하는 양으로 마커를 보이는 세포를 지칭한다. 예를 들어, 세포가 CD200에 대해 특이적인 항체로 검출가능하게 표시되고, 항체로부터의 신호가 대조군 (예를 들어, 배경 또는 이소형 대조군)의 신호보다 검출가능하게 높은 경우 세포는 "CD200⁺"이다. 반대로, 동일한 문맥에서의 "음성"은 세포 표면 마커가 대조군 (예를 들어, 배경 또는 이소형 대조군)과 비교하여 이러한 마커에 대해 특이적인 항체를 사용하여 검출가능하지 않은 것을 의미한다. 예를 들어, 세포가 대조군 (예를 들어, 배경 또는 이소형 대조군)보다 더 큰 정도로 CD34에 특이적인 항체로 재현가능하게 검출가능하게 표시되지 않을 경우, 세포는 "CD34⁻"이다. 항체를 사용하여 검출되지 않거나 검출가능하지 않은 마커는 적합한 대조군을 사용하여 유사한 방식으로 양성 또는 음성인 것으로 결정된다. 예를 들어, RT-PCR, 슬롯 블롯 등과 같은 RNA 검출 방법에 의해 결정시, 세포 또는 세포의 집단으로부터의 RNA에서 검출된 OCT-4 RNA의 양이 배경보다 검출가능하게 크면 세포 또는 세포의 집단이 OCT-4⁺인 것으로 결정될 수 있다. 본원에서 달리 표시되지 않으면, 분화 집단 ("CD") 마커는 항체를 사용하여 검출된다. 특정 실시양태에서, OCT-4가 RT-PCR을 사용하여 검출가능할 경우에, OCT-4가 존재하는 것으로 결정되고 세포는 "OCT-4⁺"이다.

[0057] 본원에 사용된 바와 같이, 유동 세포측정법에서 검출가능한 마커의 발현을 언급할 때 용어 "저"는 마커가 시험되는 세포의 10% 미만에 의해 발현되거나, 또는 예를 들어 유동 세포측정법에서 마커에 기인한 형광이 배경에 비해 1 로그 미만임을 의미한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, "치료하다"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 임의의 파라미터 또는 증상의 교정, 개선, 중증도의 완화, 또는 시간 경과에 따른 감소를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0059] 4. 도면의 간단한 설명

도 1은 태반 유래 부착 세포에 의한 선택된 혈관신생 단백질의 분비를 보여준다.

도 2는 인간 내피 세포 (HUVEC) 관 형성에 대한 태반 유래 부착 세포 조건화 배지의 혈관신생 효과를 보여준다.

도 3은 인간 내피 세포 이동에 대한 태반 유래 부착 세포 조건화 배지의 혈관신생 효과를 보여준다.

도 4는 인간 내피 세포 증식에 대한 태반 유래 부착 세포-조건화 배지의 효과를 보여준다.

도 5는 HUVEC 및 태반 유래 부착 세포의 관 형성을 보여준다.

도 6은 저산소 및 정상산소 조건 하에 태반 유래 부착 세포에 의한 VEGF 및 IL-8의 분비를 보여준다.

도 7은 병아리 용모요막 혈관신생 모델에서 혈관신생에 대한 PDAC의 양성 효과를 보여준다. bFGF: 염기성 섬유모세포 성장 인자 (양성 대조군). MDAMB231: 혈관신생 유방암 세포주 (양성 대조군). Y 축: 혈관 형성의 정도.

도 8은 병아리 용모요막 혈관신생 모델에서 혈관신생에 대한 PDAC-조건화 배지 (상청액)의 양성 효과를 보여준다. bFGF: 염기성 섬유모세포 성장 인자 (양성 대조군). MDAMB231: 혈관신생 유방암 세포주 (양성 대조군). Y 축: 혈관 형성의 정도.

도 9: 정상 세포의 배양물, 또는 정상 세포와 PDAC의 공동-배양물 내에 존재하는 과산화수소-생성 반응성 산소종. RFU ROS 활성: 반응성 산소 종에 대한 상대적 형광 단위.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 5. 상세한 설명

[0061] 5.1 혈관신생, 혈류 불량과 관련되거나 그로 인해 발생하는 질환 또는 병태의 치료

[0062] 하기 섹션 5.2에 기재된 바와 같은 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포, 예를 들어 PDAC의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 순환계 질환 또는 장애의 치료 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, PDAC는 혈관신생

이다. PDAC는 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 내피 세포 및 내피 세포 집단, 및 상피 세포 및 상피 세포 집단의 성장을 지지할 수 있다.

[0063] 5.1.1 순환계 질환

[0064] 본원에 제공된 PDAC, 상기 세포의 집단, 및 PDAC를 포함하는 세포 집단은 증가된 혈관신생이 유익할 다양한 질환 상태 또는 병태를 보이는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 질환 상태 또는 병태의 예는 심근 경색, 울혈성 심부전, 말초 동맥 질환, 좌심실 형성부전 증후군, 당뇨병성 궤양, 욕창성 궤양, 정맥 궤양, 동맥 궤양, 화상, 불유합 골절, 골관절염 및 상악안면 골 복구를 포함한다. 특정 실시양태에서, PDAC 및 상기 세포의 집단은 외상성 조직 손실을 보이는 개체에서 혈관신생을 촉진하기 위해 또는 반흔 형성을 방지하기 위해, 또는 전체 관절 대체 또는 치과 보철을 한 개체에서 사용될 수 있다.

[0065] 보다 구체적 실시양태에서, 본원에 제공된 PDAC 및 상기 세포의 집단은 순환계의 부전증이 있는 개체, 예를 들어 말초혈관 질환 또는 관상 동맥 질환이 있는 개체를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0066] 한 측면에서, 심장 또는 순환계의 질환 또는 손상이 있는 환자에게 치료 세포 조성물을 투여하고, 심장 기능의 개선에 대해 환자를 평가하는 것을 포함하는 심장 질환 또는 손상이 있는 환자의 치료 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 PDAC를 포함한다. 한 실시양태에서, 심장 질환은 심근병증이다. 구체적 실시양태에서, 심근병증은 특발성이거나, 원인이 공지된 심근병증이다. 다른 구체적 실시양태에서, 심근병증은 성질이 허혈성 또는 비허혈성이다. 또 다른 실시양태에서, 심장 또는 순환계의 질환은 혈관 성형술, 동맥류, 협심증 (가슴조임증), 대동맥 협착, 대동맥염, 부정맥, 동맥경화증, 동맥염, 비대칭 중벽 비대증 (ASH), 아테롬성동맥경화증, 심방 세동 및 조동, 박테리아 심내막염, 바르로우 증후군 (승모판 탈출증), 서맥, 버거병 (폐쇄성 혈전혈관염), 심장비대, 심근병증, 심장염, 경동맥 질환, 대동맥의 축착, 선천성 심장 질환 (선천성 심장 결손), 울혈성 심부전 (심부전), 관상 동맥 질환, 아이젠멩거 증후군, 색전증, 심내막염, 피부홍통증, 세동, 섬유근성 이형성증, 심장 차단, 심장 잡음, 고혈압, 저혈압, 특발성 영아 동맥 석회화, 가와사키병 (점막피부성 림프절 증후군, 점막피부성 림프절 질환, 영아 다발성동맥염), 대사 증후군, 미세혈관 협심증, 심근경색 (심장 발작), 심근염, 발작성 심방성 빈맥 (PAT), 결절성 동맥주위염 (다발성동맥염, 결절성 다발성동맥염), 심막염, 말초 혈관 질환, 위독기 사지 허혈, 당뇨병성 혈관병증, 정맥염, 폐동맥관 협착 (폐 협착), 레이노병, 신동맥 협착, 신혈관성 고혈압, 류마티스성 심질환, 중격 결손, 무증상성 허혈, 증후군 X, 빈맥, 다카야스 동맥염, 팔로 사징증, 대혈관 전위증, 삼첨판 폐쇄증, 동맥 줄기, 판막성 심장 질환, 정맥류성 궤양, 정맥류, 혈관염, 심실 중격 결손, 볼프-파킨슨-화이트 증후군 또는 심내막 용기 결손 중 하나 이상을 포함한다.

[0067] 다른 실시양태에서, 심장 또는 순환계의 질환은 급성 류마티스열, 급성 류마티스성 심낭염, 급성 류마티스성 심내막염, 급성 류마티스성 심근염, 만성 류마티스성 심질환, 승모판 질환, 승모판 협착, 류마티스성 승모판 폐쇄부전, 대동맥관 질환, 다른 심내막 구조의 질환, 허혈성 심장 질환 (급성 및 아급성), 협심증, 폐 순환의 질환 (급성 폐 심장 질환, 폐 색전증, 만성 폐 심장 질환), 척추후측만곡성 심장 질환, 심근염, 심내막염, 심내막심근 섬유증, 심내막 섬유탄성증, 방실 차단, 심장 리듬장애, 심근 변성, 순환계의 질환, 예를 들어 뇌혈관 질환, 뇌전 동맥의 폐쇄 및 협착, 뇌동맥의 폐쇄, 동맥, 세동맥 및 모세혈관의 질환 (아테롬성동맥경화증, 동맥류), 또는 정맥 및 림프관의 질환 중 하나 이상을 포함한다.

[0068] 또 다른 실시양태에서, 치료는 또 다른 세포 유형과 함께 또는 또 다른 세포 유형 없이 PDAC를 포함하는 치료 세포 조성물을 사용한 심근병증이 있는 개체의 치료를 포함한다. 특정 실시양태에서, 개체는 치료로부터, 예를 들어 다른 세포, 예를 들어 심장 내에 존재하는 줄기 세포 또는 전구 세포의 성장을 지지하는 세포의 능력으로부터, 조직의 조직 내성장 또는 혈관생성으로부터, 및 유익한 세포성 인자, 케모카인, 시토카인 등의 존재로부터 이익을 경험하지만, 세포는 환자 내에서 통합하거나 증식하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 환자는 세포를 사용한 치유적 치료로부터 이익을 얻지만, 세포는 환자 내에서 장기간 동안 생존하지 않는다. 한 실시양태에서, 세포는 수, 생존력 또는 생화학적 활성이 점차 감소하고, 다른 실시양태에서 세포의 감소 이전에 활성의 기간, 예를 들어 성장, 분열 또는 생화학적 활성의 기간이 있을 수 있다. 다른 실시양태에서, 노화된, 생존불가능한 또는 심지어 죽은 세포가 유익한 치료 효과를 가질 수 있다.

[0069] 순환계의 질환 또는 장애가 있는 개체의 개선 (여기서, 개체에게 본원에 제공된 PDAC 또는 치료 조성물을 투여함)은 순환계의 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선에 의해 평가 또는 입증될 수 있다.

[0070] 또 다른 실시양태에서, 순환계의 질환 또는 장애가 있는 개체의 개선 (여기서, 개체에게 본원에 제공된 PDAC, 또는 PDAC를 포함하는 치료 조성물을 투여함)은 PDAC의 투여 전의 개체에 비해 심장 기능의 하나 이상의 징후의

검출가능한 개선, 예를 들어 흉부 심장 박출량 (CO), 심장 지수 (CI), 폐 동맥 췌기압 (PAWP), 및 심장 지수 (CI), % 분획 단축 (%FS), 박출 계수 (EF), 좌심실 박출 계수 (LVEF); 좌심실 이완말기 직경 (LVEDD), 좌심실 수축말기 직경 (LVESD), 수축성 (예를 들어 dP/dt), 압력-용적 루프, 심장업 측정치, 심방 또는 심실 기능의 증가; 펌핑 효율의 증가, 펌핑 효율 손실 속도의 감소, 혈류역학 기능 손실의 감소; 및 심근병증과 관련된 합병증의 감소 중 하나 이상의 검출가능한 개선의 입증에 의해 평가 또는 입증될 수 있다.

- [0071] 본원에 제공된 PDAC, 또는 PDAC를 포함하는 치료 조성물을 수여받는 개체에서의 개선은 또한 주관적인 척도, 예를 들어 투여 후 자신의 건강 상태에 대한 개체의 자가-평가에 의해 평가할 수 있다.
- [0072] 특정 실시양태에서, 세포의 투여의 성공은 투여된 PDAC의 개체 내의 생존에 기초하지 않는다. 대신에, 성공은 상기한 바와 같이 심장 또는 순환계 건강의 개선의 하나 이상의 척도에 기초한다. 따라서, 세포는 환자의 심장에 또는 혈관 내로 통합하여 박동할 필요가 없다.
- [0073] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 치료 방법은 PDAC를 중간엽 계통을 따라, 예를 들어 심근생성, 혈관신생 또는 혈관형성 표현형을 향해, 또는 근세포, 심근세포, 내피 세포, 심근 세포, 심장의막 세포, 혈관 내피 세포, 평활근 세포 (예를 들어, 혈관 평활근 세포)와 같은 세포로 분화하도록 유도하는 것을 포함한다.
- [0074] PDAC, 또는 이러한 세포를 포함하는 치료 조성물을 그를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것은, 예를 들어 이식, 삽입 (예를 들어, 세포 자체의 또는 매트릭스-세포 조합물의 일부로서의 세포의), 주사 (예를 들어, 질환 또는 병태의 부위에 직접, 예를 들어 심근경색이 있는 개체의 심장에서 허혈 부위에 직접), 주입, 카테터를 통한 전달, 또는 세포 요법을 제공하기 위해 당업계에서 공지된 임의의 다른 수단에 의해 달성할 수 있다.
- [0075] 한 실시양태에서, 치료 세포 조성물은 그를 필요로 하는 개체에게, 예를 들어 개체에서 하나 이상의 부위로의 주사에 의해 제공된다. 구체적 실시양태에서, 치료 세포 조성물은, 예를 들어 심장 내의 허혈 영역으로 심장내 주사에 의해 제공된다. 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 심장의 표면 상에, 인접 영역으로, 또는 심지어 보다 먼 영역으로 주사된다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 질환에 걸린 또는 손상된 영역으로 향할 수 있다.
- [0076] 관상동맥 또는 혈관계의 질환 또는 병태가 있는 개체에게 PDAC를 세포가 치료상 유익할 임의의 시점에 투여할 수 있다. 특정 실시양태에서, 예를 들어 본 발명의 PDAC 또는 치료 조성물은 심근경색의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 이내에 투여된다. 심근경색에 근접한 시간대, 예를 들어 1-3 또는 1-7일 내의 투여가 심근경색에 먼 시간대, 예를 들어 3 또는 7일 후의 투여에 비해 더 바람직하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포 또는 치료 조성물은 질환 또는 병태의 최초 진단의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 이내에 투여된다.
- [0077] 심근경색의 치료에 사용하기 위한 키트를 또한 본원에서 제공한다. 키트는 예를 들어 제약상 허용되는 담체와 혼합함으로써 제약상 허용되는 형태로 제조될 수 있는, PDAC를 포함하는 치료 세포 조성물, 및 적용장치를 사용 지침서와 함께 제공한다. 이상적으로, 키트는 심근경색 또는 유사한 심장 사건이 있었던 것으로 진단된 환자에게 적용되도록 현장에서, 예를 들어 진료실에서, 또는 응급 치료 제공자에 의해 사용될 수 있다.
- [0078] 본원에 제공된 치료 방법의 구체적 실시양태에서, PDAC는 줄기 세포 (즉, PDAC가 아닌 줄기 세포), 근모세포, 근세포, 심근모세포, 심근세포, 또는 근모세포, 근세포, 심근모세포 및/또는 심근세포의 전구세포와 함께 투여된다.
- [0079] 구체적 실시양태에서, 본원에 제공된 치료 방법은 PDAC, 예를 들어 상기 세포를 포함하는 치료 조성물을 심장 또는 순환계의 질환이 있는 환자에게 투여하고; 심장 기능의 개선에 대해 환자를 평가하는 것을 포함하고, 여기서 치료 세포 조성물은 매트릭스-세포 복합체로서 투여된다. 특정 실시양태에서, 매트릭스는 적어도 상기 세포를 포함하는 스캐폴드, 바람직하게는 생체흡수성 스캐폴드이다.
- [0080] 이를 위해, 심인성, 혈관신생, 혈관기원 또는 혈관형성 경로를 따라 줄기 또는 전구 세포 분화를 자극하는 하나 이상의 인자와 접촉된 (예를 들어 그의 존재 하에 인큐베이션 또는 배양된) PDAC의 집단을 본원에서 추가로 제공한다. 이러한 인자는 성장 인자, 케모카인, 시토카인, 세포 생성물, 탈메틸화제, 및 심인성, 혈관신생, 혈관기원 또는 혈관형성 경로 또는 계통을 따라, 예를 들어 줄기 세포의 분화를 자극하는 것으로 현재 공지되거나 나중에 결정되는 기타 인자와 같은 인자를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

- [0081] 특정 실시양태에서, PDAC는 시험관내에서 탈메틸화제, BMP (골 형태발생 단백질), FGF (섬유모세포 성장 인자), Wnt 인자 단백질, 헥시호그 단백질 및/또는 항-Wnt 인자 중 하나 이상을 포함하는 인자의 존재 하에 세포의 배양에 의해 심인성, 혈관신생, 혈관기원 또는 혈관형성 경로 또는 계통을 따라 분화될 수 있다.
- [0082] 탈메틸화제의 포함은 PDAC가 중간엽 라인을 따라 심근생성 경로를 향하여 분화하도록 촉진하는 경향이 있다. 분화는, 예를 들어 심장미오신, 골격 미오신, 또는 GATA4 중 적어도 하나의 발현에 의해 (예를 들어, 면역염색 또는 RT-PCR에 의해 측정); 또는 자발적이거나 달리 유도된 박동 리듬의 수득에 의해; 또는 부정맥을 유도하지 않으면서 적어도 부분적으로 환자의 심장 근육 내로 통합되는 능력에 의해 결정될 수 있다. 이러한 분화를 개시시키기 위해 사용될 수 있는 탈메틸화제는 5-아자시티딘, 5-아자-2'-데옥시시티딘, 디메틸설폭시드, 켈레리트린 클로라이드, 레티노산 또는 그의 염, 2-아미노-4-(에틸티오)부티르산, 프로카인아미드, 및 프로카인을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0083] 본원의 특정 실시양태에서, 상기 확인된 하나 이상의 인자와 접촉된 PDAC는 심근생성, 혈관신생, 혈관기원 또는 혈관형성 세포, 또는 전구세포가 될 수 있다. 바람직하게는, 세포의 적어도 일부는 적어도 부분적으로, 심장의 심장 근육, 혈관 및 다른 구조체, 심장 또는 말초 혈관 등을 비롯한 (이에 제한되지는 않음) 수용자의 심혈관계 내로 통합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 분화된 PDAC는 심근생성 세포 또는 그의 전구세포의 2개 이상의 특성을 나타내는 세포로 분화하고, 수용자의 심장 또는 혈관계 내로 부분적으로 또는 완전히 통합될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 세포는 개체에 투여시에 부정맥, 심장 결손, 혈관 결함, 또는 개체의 순환계 또는 건강의 다른 이상을 증가시키지 않는다. 특정 실시양태에서, PDAC는, 예를 들어 심근세포로, 또는 적어도 심근생성, 혈관신생, 혈관기원 또는 혈관형성 라인을 따라 자체 분화하는, 환자의 심장 근육, 혈관, 혈액 등에 자연적으로 존재하는 줄기 세포의 분화를 촉진하는 역할을 한다.
- [0084] PDAC 및 상기 세포의 집단은 개체, 예를 들어 심장 또는 순환계의 질환, 장애 또는 병태가 있거나 그에 영향을 미치는 질환, 장애 또는 병태가 있는 개체에게 치료적으로 또는 예방적으로 제공될 수 있다. 이러한 질환, 장애 또는 병태는 아테롬성동맥경화증, 심근병증, 또는 심장 손상, 예를 들어 허혈성 손상, 예를 들어 심근경색 또는 상처 (급성 또는 만성)으로 인한 울혈성 심부전을 포함할 수 있다.
- [0085] 특정 실시양태에서, 개체에게 치료 유효량의 PDAC, 예를 들어 PDAC를 포함하는 세포 집단을 투여한다. 구체적 실시양태에서, 집단은 약 50%의 PDAC를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 집단은 PDAC의 실질적으로 균질한 집단이다. 다른 실시양태에서 집단은 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 PDAC를 포함한다.
- [0086] PDAC는 개체에게 상기 세포 및 또 다른 치료제, 예컨대 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 표피 성장 인자 (EGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 인터류킨 18 (IL-18), 항혈전형성제 (예를 들어, 헤파린, 헤파린 유도체, 우로키나제, 또는 PPACK (텍스트로페닐알라닌 프롤린 아르기닌 클로로메틸케톤)), 항트롬빈 화합물, 혈소판 수용체 길항제, 항-트롬빈 항체, 항-혈소판 수용체 항체, 아스피린, 디피리다몰, 프로타민, 히루딘, 프로스타글란딘 억제제, 및/또는 혈소판 억제제), 항아포토시스제 (예를 들어, 에리트로포이에틴 (Epo), Epo 유도체 또는 유사체, 또는 그의 염, 트롬보포이에틴 (Tpo), IGF-I, IGF-II, 간세포 성장 인자 (HGF) 또는 카스파제 억제제), 항염증제 (예를 들어, p38 MAP 키나제 억제제, 스타틴, IL-6 억제제, IL-1 억제제, 페미로라스트, 트라닐라스트, 레미케이드, 시클리무스 및/또는 비스테로이드성 항-염증성 화합물 (예를 들어, 아세틸살리실산, 이부프로펜, 테폭살린, 톨메틴 또는 수프로펜)), 면역억제제 또는 면역조절제 (예를 들어, 칼시뉴린 억제제, 예를 들어 시클로스포린, 타크롤리무스, mTOR 억제제, 예컨대 시클리무스 또는 에베롤리무스; 항증식제, 예컨대 아자티오프린 및/또는 미코페놀레이트 모페틸; 코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니솔론 또는 히드로코르티손; 항체 예컨대 모노클로날 항-IL-2R α 수용체 항체, 바실릭시맙, 다클리주마, 폴리클로날 항-T-세포 항체 예컨대 항-흉선세포 글로불린 (ATG), 항-림프구 글로불린 (ALG), 및/또는 모노클로날 항-T 세포 항체 OKT3, 또는 미국 특허 번호 7,468,276 및 미국 특허 출원 공보 번호 2007/0275362 (이들 각각의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 부착성 태반 줄기 세포), 및/또는 항산화제 (예를 들어, 프로부콜; 비타민 A, C 및/또는 E, 조효소 Q-10, 글루타티온, L 시스테인, N-아세틸시스테인, 또는 임의의 상기한 것들의 항산화제 유도체, 유사체 또는 염)를 포함하는 치료 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, PDAC를 포함하는 치료 조성물은 하나 이상의 추가의 세포 유형, 예를 들어 성체 세포 (예를 들어, 섬유모세포 또는 내배엽 세포), 줄기 세포 및/또는 전구 세포를 추가로 포함한다. 이러한 치료제 및/또는 하나 이상의 추가 유형의 세포는 이를 필요로 하는 개체에게 개별적으로, 또는 2종 이상의 이러한 화합물 또는 작용제의 조합물로 투여될 수 있다.

- [0087] 특정 실시양태에서, 치료할 개체는 포유동물이다. 구체적 실시양태에서, 치료할 개체는 인간이다. 구체적 실시양태에서, 개체는 가축 또는 애완동물이다. 다른 구체적 실시양태에서, 치료할 개체는 말, 양, 소 또는 수송아지, 돼지, 개 또는 고양이이다.
- [0088] 5.1.2 허혈성 질환의 치료
- [0089] 특정 실시양태에서, 예를 들어 말초 혈관계 내에 혈류의 파괴가 있는 개체에게 치료 유효량의 PDAC를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법을 본원에서 제공한다. 특정 구체적 실시양태에서, 허혈은 말초 동맥 질환 (PAD), 예를 들어 중증 하지 허혈 (CLI)이다. 다른 특정 실시양태에서, 허혈은 말초 혈관 질환 (PVD), 말초 동맥 질환, 허혈성 혈관 질환, 허혈성 심장 질환 또는 허혈성 신 질환이다.
- [0090] 구체적 실시양태에서, 상기 혈류 파괴는 중증 하지 허혈이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 상기 CLI는 허혈성 안정시 통증, 개인이 움직이지 않는 동안 다리 및 발의 중증 통증, 발 또는 다리 상의 비-치유성 욕창, 발의 통증 또는 무감각, 다리 또는 발의 번질번질하고 평탄하고 건조한 피부, 발톱의 비후화, 다리 또는 발의 맥박의 부재 또는 감소, 개방형 욕창, 치유되지 않는 피부 감염 또는 궤양, 및/또는 다리 또는 발의 건성 괴저 (건조한 흑색 피부)를 특징으로 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, CLI를 갖는 개체는 하나 이상의 손가락 및/또는 전체 사지의 손실을 경험한다. 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 치료 유효량은 개체의 말초 혈관계에서의 혈류 파괴에 기인한 사지 기능의 손실 및/또는 산소 박탈 (저산소증/무산소증)의 제거, 그에 있어서의 검출가능한 개선, 그의 중증도의 완화, 또는 그의 하나 이상의 증상의 진행의 지연을 일으키는 PDAC의 수이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 PDAC의 상기 치료 유효량은 상기 개체에게 예를 들어 상기 혈류 파괴 이후 사지 내의 또는 주변의 2차 또는 후속 혈류 파괴에 의해 유발된 조직 손상을 감소 또는 제거하기 위해 예방상 투여된다.
- [0091] 다른 실시양태에서, PDAC는 줄종, 예를 들어 허혈성 줄종의 치료, 예를 들어 CNS의 허혈성 영역에서의 혈관신생 촉진에 의한 줄종의 치료에 사용될 수 있다. 한 측면에서, 개체의 뇌 내부 또는 주변에서 혈류의 파괴가 있는 개체, 예를 들어 개체의 뇌 또는 중추 신경계 (CNS) 내부 또는 주변에서의 혈류 파괴에 기인하는 증상 또는 신경학적 결핍이 있는 개체에게 치료 유효량의 단리된 조직 배양 플라스틱-부착성 인간 태반 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 단리된 태반 세포에 다능 세포 또는 줄기 세포의 특성이 있는 것인, 상기 개체의 치료 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 혈류의 파괴는 개체의 뇌 또는 CNS에 무산소 손상 또는 저산소 손상을 일으킨다. 본원에서 고려되는 바와 같이, 개체의 뇌 내부 또는 주변에서의 혈류 파괴에 기인하는 개체에서의 증상 또는 신경학적 결핍의 치료는 이같은 개체의 뇌 내부 또는 주변에서의 혈류 파괴를 동반할 수 있는 재관류 손상에 기인하는 증상 또는 신경학적 결핍의 치료를 포함한다.
- [0092] 본원에 제공된 태반 세포 (예를 들어, 하기 기재된 바와 같은 PDAC)는 혈관신생성인 것 이외에도 신경보호성이 다. 특정 실시양태에서, 태반 세포는 저-산소 환경에서, 예를 들어 저산소 조건 (예를 들어, 약 5% O₂ 미만) 하에 신경보호성이다. 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 뉴런 또는 다른 신경 세포, 또는 성상 세포와 접촉시, 예를 들어 PDAC 및 뉴런의 시험관내 공동-배양물에서 신경돌기 길이의 증가에 의해 나타나는 바와 같이, 뉴런, 신경 세포 또는 성상 세포의 건강을 증진시킨다. 다른 특정 실시양태에서, PDAC는 저산소 환경에서 하나 이상의 반응성 산소 종의 농도를 감소시킨다. 또한, 특정 실시양태에서, 태반 세포 (예를 들어, PDAC)는 신경 영양성 시토카인 BDNF, VEGF, HGF, G-CSF, 신경 성장 인자 (NGF) 및/또는 뉴로트로핀-3 (NTF3) 중 하나 이상을 분비한다. 이에 따라, PDAC는 CNS 및 PNS 둘 모두에 대한 허혈성 손상, 예를 들어 줄종으로 인한 CNS에서의 신경계에 대한 허혈성 손상, 또는 위독기 사지 허혈 또는 말초 혈관 질환으로 인한 PNS에서의 신경계에 대한 허혈성 손상의 치료에 유용하다. 다른 실시양태에서, PDAC는 예를 들어 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병 및/또는 말초 신경병증, 예를 들어 당뇨병성 신경병증을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0093] 5.2 단리된 태반 세포 및 단리된 태반 세포 집단
- [0094] 순환 질환 또는 장애를 갖는 개체의 치료에 유용한 단리된 태반 세포, 예를 들어 PDAC는, 조직 배양 기판에 부착되고, 다능 세포 또는 줄기 세포의 특성을 갖지만, 영양막이 아닌, 태반 또는 그의 일부로부터 얻을 수 있는 세포이다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 유용한 단리된 태반 세포는 비-태반 세포 유형으로 분화되는 능력을 지닌다.
- [0095] 본원에 개시된 방법에서 유용한 단리된 태반 세포는 기원이 태아 또는 모체일 수 있다 (즉, 각각 태아 또는 모체의 유전자형을 가질 수 있다). 바람직하게는, 단리된 태반 세포 및 단리된 태반 세포의 집단은 태아 기원이

다. 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "태아 기원" 또는 "비-모체 기원"은 단리된 태반 세포 또는 단리된 태반 세포의 집단이 태아와 관련된, 즉 태아의 유전자형을 지니는 제대 또는 태반 구조물로부터 수득하였다는 것을 가리킨다. 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "모체 기원"은 세포 또는 세포의 집단이 모체와 관련된, 예를 들어 모체 유전자형을 지니는 태반 구조물로부터 수득하였다는 것을 가리킨다. 단리된 태반 세포, 예를 들어 PDAC, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단은 기원이 단독으로 태아 또는 모체인 단리된 태반 세포를 포함할 수 있거나, 또는 태아 및 모체 기원 양쪽 모두의 단리된 태반 세포의 혼합 집단을 포함할 수 있다. 단리된 태반 세포, 및 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단을 하기 논의된 형태학적 특성, 마커 특성, 및 배양 특성에 의해 확인 및 선택할 수 있다. 특정 실시양태에서, 임의의 태반 세포, 예를 들어 본원에 기재된 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 수용자, 예를 들어 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체에 대해 자가유래의 것이다. 다른 특정 실시양태에서, 임의의 태반 세포, 예를 들어 본원에 기재된 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 수용자, 예를 들어 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체에 대해 이종유래의 것이다.

[0096] 5.2.1 물리적 및 형태학적 특징

[0097] 본원에 기재된 단리된 태반 세포 (PDAC)는, 1차 배양 또는 세포 배양에서 배양될 때, 조직 배양 기판, 예를 들어 조직 배양 용기 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱에, 또는 세포의 매트릭스 또는 리간드, 예컨대 라미닌, 콜라겐 (예를 들어, 천연 또는 변성 콜라겐), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴, 및 세포의 막 단백질 (예를 들어, 매트릭셀®, BD 디스커버리 랩웨어(BD Discovery Labware), 매사추세츠주 베드포드)로 코팅된 조직 배양 표면에 부착한다. 배양물 내의 단리된 태반 세포는 일반적으로 섬유모세포 모양의 성상 외관을 나타내고, 다수의 세포질 돌기가 중심 세포체로부터 확장된다. 그러나, 단리된 태반 세포가 섬유모세포보다 더 많은 수의 이같은 돌기를 나타내기 때문에, 상기 세포는 동일한 조건 하에 배양된 섬유모세포로부터 형태학적으로 구별가능하다. 형태학적으로, 단리된 태반 세포는 조혈 줄기 세포로부터 또한 구별가능한데, 조혈 줄기 세포는 배양 시 더욱 둥근 형태 또는 자갈 형태를 일반적으로 나타낸다.

[0098] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 유용한 단리된 태반 세포는, 성장 배지에서 배양될 때, 배아-유사체가 발달된다. 배아-유사체는 증식하는 단리된 태반 세포의 부착 층 상에서 성장할 수 있는 세포의 불연속적 클러스터이다. 용어 "배아-유사"는 배아 줄기 세포의 배양물로부터 성장하는 세포의 클러스터가 배아체와 유사하기 때문에 사용된다. 배아-유사체가 단리된 태반 세포의 증식하는 배양물에서 발달할 수 있는 성장 배지는, 예를 들어 DMEM-LG (예를 들어, 킵코로부터); 2% 태아 소 혈청 (예를 들어, 하이클론 랩스.로부터); 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1x 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10^{-9} M 텍사메타손 (예를 들어, 시그마로부터); 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (예를 들어, 시그마로부터); 표피 성장 인자 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터)를 포함하는 배지를 포함한다.

[0099] 5.2.2 세포 표면, 분자 및 유전자 마커

[0100] 본원에 개시된 방법, 예를 들어 순환계의 질환 또는 장애의 치료 방법에 유용한 단리된 태반 세포, 예를 들어 단리된 다능 태반 세포 또는 단리된 태반 줄기 세포, 및 상기 단리된 태반 세포의 집단은 다능 세포 또는 줄기 세포의 특성을 갖고, 세포 또는 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단을 확인 및/또는 단리하는데 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현하는, 조직 배양 플라스틱-부착성 인간 태반 세포이다. 특정 실시양태에서, PDAC는, 예를 들어 시험관내 또는 생체내에서 혈관형성성다. 본원에 기재된 단리된 태반 세포 및 태반 세포 집단 (즉, 2가지 이상의 단리된 태반 세포)은 태반 또는 그의 임의의 일부분 (예를 들어, 용모막, 태반엽 등)으로부터 직접 수득되는 태반 세포 및 태반 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 단리된 태반 세포의 집단은 배양물 내의 단리된 태반 세포들 (즉, 2가지 이상)의 집단, 및 용기, 예를 들어 백 내의 집단을 또한 포함한다. 본원에 기재된 단리된 태반 세포는 골수-유래 중간엽 세포, 지방-유래 중간엽 줄기 세포, 또는 제대 혈액, 태반 혈액 또는 말초 혈액으로부터 수득된 중간엽 세포가 아니다. 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 태반 세포, 예를 들어 태반 다능 세포 및 태반 세포는, 예를 들어 미국 특허 번호 7,311,904; 7,311,905; 및 7,468,276; 및 미국 특허 출원 공보 번호 2007/0275362 (이들 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0101] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 다른 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 다능 세포이다. 한 실시양태에서, 단리된 태반 세포, 예를 들어 PDAC는 유동 세포측정법에 의해 검출시 CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골형성 표현형의 세포 및/또는 연골형성 표현형의 세포로 분화되는 잠재력을 지닌다.

또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD45^{-}$ 또는 $CD90^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD45^{-}$ 및 $CD90^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD90^{+}$ 및 $CD45^{-}$ 이고, 즉 상기 세포는 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD45^{-}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD45^{-}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 세포는 추가로 $CD80^{-}$ 및 $CD86^{-}$ 이다.

[0102] 또 다른 실시양태에서, 상기 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD200^{+}$, 및 $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD133^{-}$, $HLA-DR, DP, DQ^{-}$, $SSEA3^{-}$, $SSEA4^{-}$, $CD29^{+}$, $CD44^{+}$, $CD73^{+}$, $CD90^{+}$, $CD105^{+}$, $HLA-A, B, C^{+}$, $PDL1^{+}$, $ABC-p^{+}$, 및/또는 $OCT-4^{+}$ 중 하나 이상이다. 다른 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 세포는 추가로 $CD29^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD54^{+}$, $SH3^{+}$ 또는 $SH4^{+}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD44^{+}$ 이다. 상기 임의의 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포의 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD117^{-}$, $CD133^{-}$, KDR^{-} ($VEGFR2^{-}$), $HLA-A, B, C^{+}$, $HLA-DP, DQ, DR^{-}$, 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^{+}$) 중 하나 이상, 또는 그의 임의의 조합이다.

[0103] 또 다른 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 세포는 추가로 $CD13^{+}$, $CD29^{+}$, $CD33^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD45^{-}$, $CD54^{+}$, $CD62E^{-}$, $CD62L^{-}$, $CD62P^{-}$, $SH3^{+}$ ($CD73^{+}$), $SH4^{+}$ ($CD73^{+}$), $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $SH2^{+}$ ($CD105^{+}$), $CD106/VCAM^{+}$, $CD117^{-}$, $CD144/VE-카드헤린^{지}$, $CD184/CXCR4^{-}$, $CD200^{+}$, $CD133^{-}$, $OCT-4^{+}$, $SSEA3^{-}$, $SSEA4^{-}$, $ABC-p^{+}$, KDR^{-} ($VEGFR2^{-}$), $HLA-A, B, C^{+}$, $HLA-DP, DQ, DR^{-}$, $HLA-G^{-}$, 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^{+}$) 중 하나 이상, 또는 그의 임의의 조합이다. 또 다른 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 세포는 추가로 $CD13^{+}$, $CD29^{+}$, $CD33^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD45^{-}$, $CD54/ICAM^{+}$, $CD62E^{-}$, $CD62L^{-}$, $CD62P^{-}$, $SH3^{+}$ ($CD73^{+}$), $SH4^{+}$ ($CD73^{+}$), $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $SH2^{+}$ ($CD105^{+}$), $CD106/VCAM^{+}$, $CD117^{-}$, $CD144/VE-카드헤린^{지}$, $CD184/CXCR4^{-}$, $CD200^{+}$, $CD133^{-}$, $OCT-4^{+}$, $SSEA3^{-}$, $SSEA4^{-}$, $ABC-p^{+}$, KDR^{-} ($VEGFR2^{-}$), $HLA-A, B, C^{+}$, $HLA-DP, DQ, DR^{-}$, $HLA-G^{-}$, 및 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^{+}$)이다.

[0104] 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출시 $ABC-p^{+}$, 또는 RT-PCR에 의해 결정시 $OCT-4^{+}$ ($POU5F1^{+}$)이고, 여기서 $ABC-p$ 는 태반-특이적 ABC 수송체 단백질 (유방암 내성 단백질 (BCRP) 및 미토산트론 내성 단백질 (MXR)로도 공지됨)이고, $OCT-4$ 는 옥타머-4 단백질 ($POU5F1$)이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 결정시 $SSEA3^{-}$ 또는 $SSEA4^{-}$ 이고, 여기서 $SSEA3$ 은 단계 특이적 배아 항원 3이고, $SSEA4$ 는 단계 특이적 배아 항원 4이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 추가로 $SSEA3^{-}$ 및 $SSEA4^{-}$ 이다.

[0105] 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 $MHC-I^{+}$ (예를 들어, $HLA-A, B, C^{+}$), $MHC-II^{-}$ (예를 들어, $HLA-DP, DQ, DR^{-}$) 또는 $HLA-G^{-}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 태반 세포는 $MHC-I^{+}$ (예를 들어, $HLA-A, B, C^{+}$), $MHC-II^{-}$ (예를 들어, $HLA-DP, DQ, DR^{-}$) 및 $HLA-G^{-}$ 중 하나 이상이다.

[0106] 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된, 단리된 태반 세포의 집단, 또는 세포의 집단, 예를 들어 태반 세포의 집단이 또한 본원에 제공된다. 세포의 집단이 예를 들어 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%의 단리된 $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $CD34^{-}$ 태반 세포를 포함하는; 즉, 상기 집단 내의 세

포의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%가 단리된 $CD10^+$, $CD105^+$ 및 $CD34^-$ 태반 세포인, 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이 바람직하다. 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출시 $CD90^+$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD29^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD54^+$, $SH3^+$ 또는 $SH4^+$ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포, 또는 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 세포는 추가로 $CD44^+$ 이다. 상기 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포를 포함하는 임의의 세포 집단의 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 추가로 $CD13^+$, $CD29^+$, $CD33^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54^+$, $CD62E^-$, $CD62L^-$, $CD62P^-$, $SH3^+$ ($CD73^+$), $SH4^+$ ($CD73^+$), $CD80^-$, $CD86^-$, $CD90^+$, $SH2^+$ ($CD105^+$), $CD106/VCAM^+$, $CD117^-$, $CD144/VE-$ 카드헤린^제, $CD184/CXCR4^-$, $CD200^+$, $CD133^-$, $OCT-4^+$, $SSEA3^-$, $SSEA4^-$, $ABC-p^+$, KDR^- ($VEGFR2^-$), $HLA-A,B,C^+$, $HLA-DP,DQ,DR^-$, $HLA-G^-$, 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^+$) 중 하나 이상, 또는 그의 임의의 조합이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 세포는 추가로 $CD13^+$, $CD29^+$, $CD33^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54/ICAM^+$, $CD62E^-$, $CD62L^-$, $CD62P^-$, $SH3^+$ ($CD73^+$), $SH4^+$ ($CD73^+$), $CD80^-$, $CD86^-$, $CD90^+$, $SH2^+$ ($CD105^+$), $CD106/VCAM^+$, $CD117^-$, $CD144/VE-$ 카드헤린^제, $CD184/CXCR4^-$, $CD200^+$, $CD133^-$, $OCT-4^+$, $SSEA3^-$, $SSEA4^-$, $ABC-p^+$, KDR^- ($VEGFR2^-$), $HLA-A,B,C^+$, $HLA-DP,DQ,DR^-$, $HLA-G^-$, 및 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^+$)이다.

[0107] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 $CD10^+$, $CD29^+$, $CD34^-$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54^+$, $CD90^+$, $SH2^+$, $SH3^+$, $SH4^+$, $SSEA3^-$, $SSEA4^-$, $OCT-4^+$ 및 $ABC-p^+$ 중의 하나 이상 또는 전부이고, 여기서 상기 단리된 태반 세포는 태반 조직의 물리적 및/또는 효소적 파괴에 의해 수득된다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$ 및 $ABC-p^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$ 및 $CD34^-$ 이고, 여기서 상기 단리된 태반 세포는 다음 특징 중 적어도 하나를 갖는다: $CD10^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54^+$, $CD90^+$, $SH3^+$, $SH4^+$, $SSEA3^-$ 및 $SSEA4^-$. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54^+$, $CD90^+$, $SH3^+$, $SH4^+$, $SSEA3^-$ 및 $SSEA4^-$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$, $CD34^-$, $SSEA3^-$ 및 $SSEA4^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$ 및 $CD34^-$ 이고, $SH2^+$ 또는 $SH3^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$, $CD34^-$, $SH2^+$ 및 $SH3^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$, $CD34^-$, $SSEA3^-$, 및 $SSEA4^-$ 이고, $SH2^+$ 또는 $SH3^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$ 및 $CD34^-$, 및 $SH2^+$ 또는 $SH3^+$ 이고, $CD10^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54^+$, $CD90^+$, $SSEA3^-$, 또는 $SSEA4^-$ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD45^-$, $CD54^+$, $CD90^+$, $SSEA3^-$ 및 $SSEA4^-$, 및 $SH2^+$ 또는 $SH3^+$ 이다.

[0108] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 $SH2^+$, $SH3^+$, $SH4^+$ 및 $OCT-4^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $CD10^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, $CD34^-$, $CD45^-$, $SSEA3^-$, 또는 $SSEA4^-$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $SH2^+$, $SH3^+$, $SH4^+$, $SSEA3^-$ 및 $SSEA4^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 $SH2^+$, $SH3^+$, $SH4^+$, $SSEA3^-$ 및 $SSEA4^-$, $CD10^+$, $CD29^+$, $CD44^+$, $CD54^+$, $CD90^+$, $OCT-4^+$, $CD34^-$ 또는 $CD45^-$ 이다.

[0109] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 $CD10^+$, $CD29^+$, $CD34^-$,

CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, 및 SH4⁺이고; 상기 분리된 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺, SSEA3⁻ 또는 SSEA4⁻ 중 하나 이상이다.

[0110] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포는 CD200⁺ 또는 HLA-G⁻이다. 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 CD200⁺ 및 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 추가로 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 CD200⁺ 또는 HLA-G⁻ 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 분리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 줄기 또는 다능 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포는 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 분리된다.

[0111] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 CD200⁺, HLA-G⁻ 줄기 세포를 포함하는, 예를 들어 이에 대해 풍부화된 세포의 집단이다. 구체적 실시양태에서, 상기 집단은 태반 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포 집단 내의 세포의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%가 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포 집단 내의 세포의 적어도 약 70%가 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포이다. 보다 바람직하게는, 상기 세포의 적어도 약 90%, 95% 또는 99%가 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포이다. 세포 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 또한 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포 집단은 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 하나 이상의 배아-유사체를 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 CD200⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 이러한 마커들을 나타내지 않는 태반 세포로부터 분리된다.

[0112] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 치료 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포는 CD73⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, 및 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 CD73⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺ 태반 세포는 분리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 분리된 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 이러한 마커들을 나타내지 않는 태반 세포로부터 분리된다.

[0113] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 치료 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 분리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포 집단 중 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%의 세포는 분리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 70%의 상기 세포는 분리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 세포는 분리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 추가로

CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ 및 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체를 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포의 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0114] 다른 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, HLA-G⁻ 또는 ABC-p⁺ 중 하나 이상이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, 및 SH4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-G⁻, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 ABC-p⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻ 및 SSEA4⁻ 태반 세포는 추가로 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺ 및 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻이고, SH3⁺ 또는 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁻, 및 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺ 또는 OCT-4⁺이다.

[0115] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 CD200⁺ 및 OCT-4⁺이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 단리된 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에 의한 하나 이상의 배아-유사체의 생성을 촉진한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 이들 특성을 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0116] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포 집단 중 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%의 세포는 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 약 70%의 상기 세포는 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 세포는 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포이다. 단리된 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로

CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포 집단은 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 하나 이상의 배아-유사체를 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0117] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 상기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0118] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 70%의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁻ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0119] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이고, 상기 CD73⁺, CD105⁺ 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 이들 특성을 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

- [0120] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 $CD73^+$, $CD105^+$ 인 단리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이고, 상기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포 집단 내의 세포의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%가 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 70%의 세포는 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 90%, 95% 또는 99%의 세포는 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $OCT-4^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT-4^+$ 및 $CD200^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 상기 단리된 $CD73^+$, $CD105^+$ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.
- [0121] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 $OCT-4^+$ 이고, 상기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 $OCT-4^+$ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 이들 특성을 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.
- [0122] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 $OCT-4^+$ 인 단리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이고, 상기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%의 세포는 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 70%의 세포는 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 80%, 90%, 95% 또는 99%의 세포는 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 $OCT-4^+$ 태반 세포는 추가로 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.
- [0123] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 단리된 $HLA-A, B, C^+$, $CD45^-$,

CD133⁻ 및 CD34⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 분리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이고, 여기서 상기 분리된 세포의 집단 내의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%의 세포는 분리된 HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단은 HLA-A,B,C⁺, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포의 집단은 실질적으로 모체 성분을 함유하지 않고, 예를 들어 상기 분리된 태반 세포의 집단 중 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 상기 세포가 비-모체 기원이다.

[0124] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포는 분리된 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 분리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이고, 여기서 상기 세포 집단 내의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%의 세포는 상기 분리된 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻ 태반 줄기 세포는 비-모체 기원이며, 즉 태아 유전자형을 갖는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포의 집단 중 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단은 이들 특성을 나타내지 않는 태반 세포로부터 분리된다.

[0125] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포는 분리된 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻ 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 분리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이고, 여기서 상기 세포 집단 내의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%의 세포는 분리된 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 분리된다.

[0126] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포는 분리된 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 분리된 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ 및 CD117⁻ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이러한 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단이고, 여기서 상기 집단 내의 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%의 세포는 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻ 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 분리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단은 이들 특성을 나타내지 않는 태반 세포로부터 분리된다.

[0127] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포는 HLA A,B,C⁺, CD45⁻, CD34⁻ 및 CD133⁻이고, 추가로 CD10⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ 및/또는 HLA-G⁻, 및/또는 CD117 음성이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에서 유용한 세포 집단은 분리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이고, 여기서 상기 집단 내의 적어도 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 약 99%의 세포는, HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고, 추가로 CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 양성, 및/또는 CD117 및/또는 HLA-G 음성인 단리된 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 이들 마커를 나타내지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0128] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 항체 결합에 의해 결정시 CD200⁺ 및 CD10⁺이고, 항체 결합 및 RT-PCR 둘 모두에 의해 결정 시 CD117⁻인 단리된 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는, CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁻, MHC 클래스 I⁺ 및 β -2-마이크로글로불린⁺인 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 태반 세포이고, 여기서 적어도 하나의 세포 마커의 발현은 중간엽 줄기 세포 (예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포)보다 적어도 2배 더 높다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 상기 세포는 비-모체 기원이다.

[0129] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린⁺, CD184/CXCR4⁻, β 2-마이크로글로불린⁺, MHC-I⁺, MHC-II⁻, HLA-G⁺ 및/또는 PDL1⁺ 중 하나 이상인 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD29⁺ 및 CD54⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD44⁺ 및 CD106⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD29⁺이다.

[0130] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포 집단은 단리된 태반 세포를 포함하고, 상기 세포 집단의 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린⁺, CD184/CXCR4⁻, β 2-마이크로글로불린⁺, HLA-I⁺, HLA-II⁻, HLA-G⁺ 및/또는 PDL1⁺ 중 하나 이상인 단리된 태반 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 집단 내의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린⁺, CD184/CXCR4⁻, β 2-마이크로글로불린⁺, MHC-I⁺, MHC-II⁻, HLA-G⁺, 및 PDL1⁺다.

[0131] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는, CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, 및 ABC-p⁺ 중 하나 이상 또는 전부인 단리된 태반 세포이고, 여기서 ABC-p는 태반-특이적 ABC 수송체 단백질 (유방암 내성 단백질 (BCRP) 및 미톡산트론 내성 단백질 (MXR)로도 공지됨)이고, 상기 단리된 태반 세포는 제대혈을 빼내고 잔여 혈액을 제거하기 위해 관류시킨 포유동물, 예를 들어 인간 태반의 관류에 의해 수득한다.

[0132] 임의의 상기 특성의 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포 마커 (예를 들어, 분화 클러스터 또는 면역원성 마커)의 발현은 유동 세포측정법에 의해 결정하고; 또 다른 구체적인 특정 실시양태에서, 마커의 발현은 RT-PCR에 의해 결정한다.

[0133] 유전자 프로파일링에서, 단리된 태반 세포, 및 단리된 태반 세포의 집단이 다른 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포, 예를 들어 골수-유래 중간엽 줄기 세포와 구별된다는 것이 확인된다. 유전자의 발현이 골수-유래 중간엽 줄기 세포와 비교하여 단리된 태반 세포에서 또는 단리된 특정 체대 줄기 세포에서 유의하게 더 높은 하나 이상의 유전자의 발현을 기초로, 본원에 기재된 단리된 태반 세포가, 예를 들어 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수

있다. 특히, 본원에 제공된 치료 방법에 유용한 단리된 태반 세포는 세포가 동등한 조건 하에 성장할 때 그의 발현이 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 단리된 태반 세포에서 유의하게 더 높은 (즉, 적어도 2배 더 높은) 하나 이상의 유전자의 발현을 기초로 하여 중간엽 줄기 세포, 예를 들어 골수-유래 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수 있고, 여기서 하나 이상의 유전자는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, 또는 임의의 상기 유전자의 조합이다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 2007/0275362 (그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 특정 구체적 실시양태에서, 상기 하나 이상의 유전자의 상기 발현은 예를 들어 RT-PCR 또는 예를 들어 U133-A 마이크로어레이 (아피메트릭스)를 사용한 마이크로어레이 분석에 의해 결정된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 DMEM-LG (예를 들어, 김코로부터); 2% 태아 소 혈청 (예를 들어, 하이클론 랩스.로부터); 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1x 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10^{-9} M 텍사메타손 (예를 들어, 시그마로부터); 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (예를 들어, 시그마로부터); 표피 성장 인자 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/mL (예를 들어, 알앤디 시스템즈로부터)를 포함하는 배지에서 많은 집단 배가, 예를 들어 약 3 내지 약 35 집단 배가 중 임의의 시점 동안 배양될 때 상기 하나 이상의 유전자를 발현한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포-특이적 또는 단리된 제대 세포-특이적 유전자는 CD200이다.

[0134] 이러한 유전자에 대한 특정한 서열은 2008년 3월 진뱅크 등록 번호 NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), (NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215 (FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPRC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 또는 BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN) 및 BC005001 (ZC3H12A)에서 찾아볼 수 있다.

[0135] 특정 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A 각각을 동등한 조건 하에 배양되는 경우의 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 높은 수준으로 발현한다.

[0136] 구체적 실시양태에서, 태반 세포는 CD200 및 ARTS1 (유형 1 종양 괴사 인자의 아미노펩티다제 조절제); ARTS-1 및 LRAP (백혈구-유래 아르기닌 아미노펩티다제); IL6 (인터류킨-6) 및 TGFB2 (형질전환 성장 인자, 베타 2); IL6 및 KRT18 (케라틴 18); IER3 (극초기 반응 3), MEST (중배엽 특이적 전사체 상동체) 및 TGFB2; CD200 및 IER3; CD200 및 IL6; CD200 및 KRT18; CD200 및 LRAP; CD200 및 MEST; CD200 및 NFE2L3 (핵 인자 (적혈구-유래 2)-유사 3); 또는 CD200 및 TGFB2를 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BM-MSC)보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현하고, 여기서 상기 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 배양시에 상기 태반 줄기 세포가 겪은 계대 배양 횟수와 동일한 횟수의 계대배양을 겪은 것이다. 다른 구체적 실시양태에서, 태반 세포는 ARTS-1, CD200, IL6 및 LRAP; ARTS-1, IL6, TGFB2, IER3, KRT18 및 MEST; CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, 및 TGFB2; ARTS-1, CD200, IER3, IL6, KRT18, LRAP, MEST, NFE2L3, 및 TGFB2; 또는 IER3, MEST 및 TGFB2를 동일한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BM-MSC)보다 검출가능하게 더 높은 수준에서 발현하고, 여기서 상기 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 배양시에 상기 단리된 태반 세포가 겪은 계대배양 횟수와 동일한 횟수의 계대배양을 겪은 것이다.

[0137] 상기 언급된 유전자들의 발현을 표준 기술에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, 통상적인 기술에 의해 유전자 (들)의 서열을 기초로 하는 프로브들을 개별적으로 선택하여 구축할 수 있다. 예를 들어, 유전자들 중 하나 이상에 대한 프로브를 포함하는 마이크로어레이, 예를 들어 아피메트릭스의 진칩(GENECHIP)® 인간 게놈 U133A 2.0 어레이, 또는 아피메트릭스의 진칩® 인간 게놈 U133 플러스 2.0 (캘리포니아주 산타 클라라) 상에서 유전

자의 발현을 평가할 수 있다. 특정 진뱅크 등록 번호에 대한 서열이 수정되더라도 이러한 유전자들의 발현을 평가할 수 있는데, 이는 수정된 서열에 대해 특이적인 프로브가 널리 공지된 표준 기술을 사용하여 쉽게 생성될 수 있기 때문이다.

[0138] 이러한 유전자들의 발현 수준은 단리된 태반 세포의 집단의 정체를 확인하는 것, 적어도 다수의 단리된 태반 세포를 포함하는 것으로 세포의 집단을 확인하는 것 등에 사용될 수 있다. 정체가 확인된, 단리된 태반 세포의 집단은 클론성일 수 있고, 예를 들어 단일 단리된 태반 세포로부터 확장된 단리된 태반 세포의 집단, 예를 들어 여러 단리된 태반 세포들로부터 확장된 단리된 태반 세포를 단독으로 포함하는 세포의 집단, 또는 본원에 기재된 바와 같은 단리된 태반 세포들 및 하나 이상의 또 다른 유형의 세포를 포함하는 세포의 집단일 수 있다.

[0139] 이러한 유전자들의 발현 수준은 단리된 태반 세포의 집단을 선택하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 열거된 유전자들 중 하나 이상의 발현이 중간엽 줄기 세포들의 동등한 집단에서보다 세포의 집단으로부터의 샘플에서 유의하게 더 높은 경우 세포들, 예를 들어 클론-확장 세포의 집단이 선택될 수 있다. 이같은 선택은 다수의 단리된 태반 세포 집단, 정체가 공지되지 않은 다수의 세포의 집단 등으로부터의 집단의 선택일 수 있다.

[0140] 단리된 태반 세포를 하나 이상의 이같은 유전자의 발현 수준을 기초로, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 대조군에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준, 예를 들어 동일한 개수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준과 비교하여 선택할 수 있다. 한 실시양태에서, 동일한 수의 중간엽 줄기 세포를 포함하는 샘플에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군으로 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 특정 조건 하에 시험된 단리된 태반 세포에 대한 대조군은 상기 조건 하에서의 중간엽 줄기 세포에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 나타내는 수치이다.

[0141] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 유용한 태반 세포 (예를 들어, PDAC)는 1 내지 100 ng/mL VEGF에 4 내지 21일 동안 노출한 후 면역학적 위치 결정에 의해 검출시 CD34를 발현하지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 부착 세포는 조직 배양 플라스틱에 부착성이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 세포 집단은, 예를 들어 매트릭젤™과 같은 기재 상에서 혈관신생 인자, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 상피 성장 인자 (EGF), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 또는 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)의 존재 하에 배양될 때 내피 세포가 싹 또는 관-유사 구조를 형성하도록 유도한다.

[0142] 또 다른 측면에서, 본원에 제공된 PDAC, 세포 집단, 예를 들어 PDAC의 집단, 또는 상기 단리된 세포 집단 내의 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98%가 PDAC인 세포 집단은 VEGF, HGF, IL-8, MCP-3, FGF2, 폴리스타틴, G-CSF, EGF, ENA-78, GRO, IL-6, MCP-1, PDGF-BB, TIMP-2, uPAR, 또는 갈락틴-1 중 하나 이상 또는 전부를, 예를 들어 세포 또는 세포들이 성장하는 배양 배지 내로 분비한다. 또 다른 실시양태에서, PDAC는 정상산소 조건 (예를 들어, 약 20% 또는 약 21% O₂)과 비교하여 저산소 조건 (예를 들어, 약 5% O₂ 미만) 하에 CD202b, IL-8 및/또는 VEGF의 증가된 수준을 나타낸다.

[0143] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 PDAC, 또는 PDAC를 포함하는 세포 집단은 상기 태반 유래 부착 세포와 접촉하는 내피 세포의 집단에서 싹 또는 관-유사 구조의 형성을 일으킬 수 있다. 구체적인 실시양태에서, PDAC는 인간 내피 세포와 공동-배양되어, 예를 들어 적어도 4일 동안 태반 콜라겐 또는 매트릭젤™과 같은 기재 내에서 또는 상에서 세포외 매트릭스 단백질, 예를 들어 콜라겐 유형 I 및 IV, 및/또는 혈관신생 인자, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 상피 성장 인자 (EGF), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF) 또는 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)의 존재 하에 배양될 때 싹 또는 관-유사 구조를 형성하거나 내피 세포 발아를 지지한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 태반 유래 부착 세포를 포함하는 임의의 세포 집단은 혈관신생 인자, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 또는 인터류킨-8 (IL-8)을 분비하고, 그에 의해 인간 내피 세포가, 예를 들어 태반 콜라겐 또는 매트릭젤™과 같은 기재 내에서 또는 상에서 세포외 매트릭스 단백질, 예를 들어 콜라겐 유형 I 및 IV의 존재 하에 배양될 때 싹 또는 관-유사 구조를 형성하도록 유도할 수 있다.

[0144] 또 다른 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포 (PDAC)를 포함하는 임의의 상기 세포 집단은 혈관신생 인자를 분비한다. 구체적인 실시양태에서, 세포 집단은 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 및/또는 인터류킨-8 (IL-8)을 분비한다. 다른 구체적인 실시양태에서, PDAC를 포함하는 세포 집단은 하나 이상의 혈관신생 인자를 분비하여, 인간 내피 세포가 시험관 내 상처 치유 검정에서 이동하도록 유도한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포를 포함하는 세포 집단은 인간 내피 세포, 내피 전구체, 근세포 또는 근모세포의 성숙, 분화 또는 증식을 유도한다.

- [0145] 본원에 기재된 단리된 태반 세포는, 예를 들어 DMEM-LG (김코), 2% 태아 소 혈청 (FCS) (하이클론 래보러토리즈), 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS), 1x 리놀렌산-소 혈청 알부민 (LA-BSA), 10^{-9} M 텍사메타손 (시그마), 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (시그마), 표피 성장 인자 (EGF) 10 ng/ml (알앤디 시스템즈), 혈 소관 유래-성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/ml (알앤디 시스템즈), 및 100U 페니실린/1000U 스트렙토마이신을 포함하는 배지에서 1차 배양에서 또는 증식 동안 상기 특성 (예를 들어, 세포 표면 마커 및/또는 유전자 발현 프로파일의 조합)을 나타낸다.
- [0146] 본원에 개시된 임의의 태반 세포의 특정 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 본원에 개시된 임의의 태반 세포의 특정 실시양태에서, 세포 마커 특성 또는 유전자 발현 특성은 인간 마커 또는 인간 유전자에 대한 것이다.
- [0147] 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 또는 집단은 확장되었으며, 예를 들어 최소, 약 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20회, 또는 그 초과로 계대배양되었거나, 또는 최소, 약 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50 집단 배개로 증식하였다. 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 또는 집단은 1차 분리주이다. 본원에 개시된, 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태아 기원이다 (즉, 태아 유전자형을 지닌다).
- [0148] 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 성장 배지, 즉, 증식을 촉진하도록 제조된 배지에서 배양 동안, 예를 들어 성장 배지에서 증식 동안 분화하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 증식하기 위해 피더 층을 필요로 하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단지 피더 세포층의 부재로 인해, 상기 단리된 태반 세포는 피더 층의 부재 하에 배양물에서 분화되지 않는다.
- [0149] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포는 단리된 태반 세포이고, 여기서 다수의 상기 단리된 태반 세포는 알데히드 데히드로게나제 (ALDH) 활성 검정에 의해 평가시 알데히드 데히드로게나제에 대해 양성이다. 이러한 검정은 당업계에서 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Bostian and Berts, Biochem. J., 173, 787, (1978)] 참조). 구체적 실시양태에서, 상기 ALDH 검정은 알데플루오르(ALDEFLUOR)® (알다젠, 인크.(Aldagen, Inc.), 오레곤주 애쉬랜드)를 알데히드 데히드로게나제 활성의 마커로 사용한다. 구체적 실시양태에서, 상기 다수는 상기 세포의 집단 내의 세포의 약 3% 내지 약 25%이다. 또 다른 실시양태에서, 알데플루오르®를 알데히드 데히드로게나제 활성의 지표로 사용하는 알데히드 데히드로게나제 활성 검정에 의해 평가시, 다수의 단리된 태반 세포가 알데히드 데히드로게나제에 대해 양성인, 단리된 태반 세포, 예를 들어 다능 단리된 태반 세포의 집단이 본원에서 제공된다. 구체적 실시양태에서, 상기 다수는 상기 세포의 집단 내의 세포의 약 3% 내지 약 25%이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포 또는 단리된 태반 세포의 상기 집단은 세포수가 대략 동일하고 동일한 조건 하에 배양된 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 집단보다 3배 이상, 또는 5배 이상 더 높은 ALDH 활성을 나타낸다.
- [0150] 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 포함하는 임의의 세포 집단의 특정 실시양태에서, 상기 세포 집단 내의 태반 세포에는 모체 유전자형을 지니는 세포가 실질적으로 없다; 예를 들어, 상기 집단 내의 태반 세포의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 태아 유전자형을 지닌다. 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 포함하는 임의의 세포 집단의 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 세포를 포함하는 세포의 집단에는 모체 유전자형을 지니는 세포가 실질적으로 없다; 예를 들어, 상기 집단 내의 세포의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 태아 유전자형을 지닌다.
- [0151] 임의의 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 세포 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 세포, 또는 상기 집단 내의 세포의 적어도 약 95% 또는 약 99%의 핵형이 정상이다. 임의의 상기 태반 세포 또는 세포 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포, 또는 세포의 집단 내의 세포는 비-모체 기원이다.
- [0152] 임의의 상기 마커 조합을 보유하는, 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단이 임의의 비율로 조합될 수 있다. 임의의 2가지 이상의 상기 단리된 태반 세포의 집단이 조합되어 단리된 태반 세포의 집단을 형성할 수 있다. 예를 들어, 단리된 태반 세포의 집단이 상기 기재된 마커 조합들 중 하나에 의해 정의되는 단리된 태반 세포의 제1 집단, 및 또 다른 상기 기재된 마커 조합에 의해 정의되는 단리된 태반 세포의 제2 집단을 포함

할 수 있고, 이때 상기 제1 집단과 제2 집단은 약 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 또는 약 99:1의 비율로 조합된다. 유사한 방식으로, 임의의 3, 4, 5가지 또는 그 초과와 상기 기재된 단리된 태반 세포 또는 단리된 태반 세포의 집단이 조합될 수 있다.

[0153] 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 단리된 태반 세포는 효소 소화 (섹션 5.3.3 참조) 또는 관류 (섹션 5.3.4 참조)를 사용하거나 사용하지 않으면서, 예를 들어 태반 조직의 파괴에 의해 얻을 수 있다. 예를 들어, 제대혈이 배출되었고 잔류 혈액이 제거되도록 관류된 포유동물 태반을 관류시키는 것; 상기 태반에 관류 용액을 관류시키는 것; 및 상기 관류 용액을 수집하는 것 (여기서, 관류 후의 상기 관류 용액은 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 포함함); 및 상기 세포의 집단으로부터 다수의 상기 단리된 태반 세포를 단리하는 것을 포함하는 방법에 따라 단리된 태반 세포의 집단이 생성될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 관류 용액은 제대 정맥 및 제대 동맥 둘 모두를 통과하고, 태반으로부터 삼출된 후 수집된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하고 제대 동맥으로부터 수집되거나, 또는 제대 동맥을 통과하고 제대 정맥으로부터 수집된다.

[0154] 다양한 실시양태에서, 태반의 관류로부터 수득된 세포의 집단 내에 함유된 단리된 태반 세포는 상기 태반 세포의 집단의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 적어도 99.5%이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류에 의해 수집된 단리된 태반 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류에 의해 수집된 단리된 태반 세포는 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 적어도 99.5% 태아 세포이다.

[0155] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류에 의해 수집된, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 태반 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 상기 조성물은 단리된 태반 세포를 수집하는데 사용된 관류 용액의 적어도 일부분을 포함한다.

[0156] 본원에 기재된 단리된 태반 세포의 단리된 집단은, 태반 조직을 조직-파괴 효소로 소화시켜 이러한 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 수득하고, 다수의 태반 세포를 나머지 상기 태반 세포로부터 단리하거나 또는 실질적으로 단리함으로써 생성될 수 있다. 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 수득하기 위해 전체 태반 또는 그의 임의의 일부분이 소화될 수 있다. 예를 들어, 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 조직은 전체 태반, 양막, 용모막, 양막과 용모막의 조합물, 또는 임의의 상기의 것들의 조합물일 수 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조직 파괴 효소는 트립신 또는 콜라게나제이다. 다양한 실시양태에서, 태반 소화로부터 수득된 세포의 집단 내에 함유된 단리된 태반 세포는 상기 태반 세포의 집단의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 적어도 99.5%이다.

[0157] 상기 기재된 태반 세포의 단리된 집단, 및 단리된 태반 세포의 집단은 일반적으로 대략, 최소 또는 최대 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 그 초과와 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 치료 방법에 유용한 단리된 태반 세포의 집단은, 예를 들어 트리판 블루 배제에 의해, 예를 들어 결정시 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 생존 단리된 태반 세포를 포함한다.

[0158] 5.2.3 배양물의 성장

[0159] 섹션 5.4.2에서 본원에 기재된 단리된 태반 세포의 성장은, 임의의 포유동물 세포에 대해서와 같이, 성장에 선택된 특정 배지에 부분적으로 좌우된다. 최적의 조건 하에, 단리된 태반 세포는 전형적으로 약 1일 내에 개수가 배가된다. 배양 동안, 본원에 기재된 단리된 태반 세포는 배양 시의 기관, 예를 들어 조직 배양 컨테이너 (예를 들어, 조직 배양 접시 플라스틱, 피브로백틴-코팅 플라스틱 등)의 표면에 부착하여, 단층을 형성한다.

[0160] 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단은, 적합한 조건 하에 배양될 때, 배아-유사체를 형성할 수 있고, 즉, 세포의 3차원 클러스터가 부착 세포층의 상부에서 성장한다. 배아-유사체 내의 세포는 극 초기 줄기 세포와 관련된 마커, 예를 들어 OCT-4, Nanog, SSEA3 및 SSEA4를 발현한다. 전형적으로 배아-유사체 내의 세포는 본원에 기재된 단리된 태반 세포가 부착성인 것과 같이 배양 기관에 대해 부착성이 아니지만, 배양 동안 이러한 부착 세포에 부착된 채 유지되는 경향이 있다. 배아-유사체 세포는 생존성을 위해 부착성의 단리된 태반 세포에 의존적인데, 이는 부착성의 단리된 태반 세포의 부재 하에 배아-유사체가 형성되지 않기 때문이다. 따라서 부착성의 단리된 태반 세포는 부착성의 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 성장을 촉진한다. 이론에 의해 제한되기를 원치 않으면서, 배아 줄기 세포가 피더 세포

층 상에서 성장하는 것과 같이 배아-유사체의 세포가 부착성의 단리된 태반 세포 상에서 성장하는 것으로 생각된다.

[0161] 5.3 단리된 태반 세포를 수득하는 방법

[0162] 5.3.1 줄기 세포 수집 조성물

[0163] 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기술된 단리된 태반 세포를 수집하고 단리하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 일반적으로, 이같은 세포는 생리학상 허용되는 용액, 예를 들어 세포 수집 조성물을 사용하여 포유동물 태반으로부터 수득한다. 예시적인 세포 수집 조성물이 관련된 미국 특허 출원 공보 번호 2007/0190042 (발명의 명칭 "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs")에 상세하게 기재되어 있고, 그 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0164] 세포 수집 조성물은 세포, 예를 들어 본원에 기재된 단리된 태반 세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 임의의 생리학상 허용되는 용액, 예를 들어 염수 용액 (예를 들어, 인산염-완충 염수, 크렙(Kreb) 용액, 변형된 크렙 용액, 이글(Eagle) 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0165] 세포 수집 조성물은 단리된 태반 세포를 보존하는 경향이 있는, 즉, 수집 시간에서 배양 시간까지, 단리된 태반 세포의 사멸을 방지하는 것, 또는 단리된 태반 세포의 사멸을 지연시키는 것, 사멸하는 세포의 집단 내의 단리된 태반 세포의 수를 감소시키는 것 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 상기 성분은 예를 들어 아포토시스 억제제 (예를 들어, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제 (예를 들어, 황산마그네슘, 항고혈압 약물, 심방 나트륨이노 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 나트륨 니트로푸루시드, 히드랄라진, 아데노신 트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포디에스테라제 억제제 등); 괴사 억제제 (예를 들어, 2-(1H-인돌-3-일)-3-벤질아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카르바메이트, 또는 클로나제팜); TNF- α 억제제; 및/또는 산소-운반 퍼플루오로탄소 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0166] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, RNase, 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 이같은 효소에는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스토리티쿰(Clostridium histolyticum)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 썬모리신, 엘라스타제, 트립신, 리베라제(LIBERASE), 히알루로니다제 등이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0167] 세포 수집 조성물은 살균 유효량 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 비-제한적인 특정 실시양태에서, 항생제는 매크롤리드 (예를 들어, 토브라마이신), 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 V) 또는 퀴놀론 (예를 들어, 오픈록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라시클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시양태에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 박테리아, 예를 들어 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa), 스탕필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 등에 대해 활성이다. 한 실시양태에서, 항생제는 젠타마이신 (예를 들어, 배양 배지 내의 약 0.005% 내지 약 0.01% (w/v))이다.

[0168] 세포 수집 조성물은 하기 화합물들 중 하나 이상을 또한 포함할 수 있다: 아데노신 (약 1 mM 내지 약 50 mM); D-글루코스 (약 20 mM 내지 약 100 mM); 마그네슘 이온 (약 1 mM 내지 약 50 mM); 분자량이 20,000 달톤을 초과하는 거대분자 (한 실시양태에서, 내피 온전성 및 세포 생존성을 유지하는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 합성 또는 천연 발생 콜로이드, 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜 (약 25 g/l 내지 약 100 g/l, 또는 약 40 g/l 내지 약 60 g/l로 존재)); 항산화제 (예를 들어, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E (약 25 μ M 내지 약 100 μ M로 존재)); 환원제 (예를 들어, N-아세틸시스테인 (약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재)); 세포 내로의 칼슘 유입을 방지하는 작용제 (예를 들어, 베라파밀 (약 2 μ M 내지 약 25 μ M로 존재)); 니트로글리세린 (예를 들어, 약 0.05 g/l 내지 약 0.2 g/l); 항응고제 (한 실시양태에서, 잔류 혈액의 응고 방지를 돕는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 헤파린 또는 히루딘 (약 1000 유닛/l 내지 약 100,000 유닛/l의 농도로 존재)); 또는 아밀로리드 함유 화합물 (예를 들어, 아밀로리드, 에틸 이소프로필 아밀로리드, 헥사메틸렌 아밀로리드, 디메틸 아밀로리드 또는 이소부틸 아밀로리드 (약 1.0 μ M 내지 약 5 μ M로 존재)).

[0169] 5.3.2 태반의 수집 및 취급

[0170] 일반적으로, 인간 태반은 출산 후 그의 만출 직후에 회수된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 환자로부터 사

전 동의 후에, 및 환자의 완전한 병력을 취하여 태반과 관련시킨 후에 회수된다. 바람직하게는, 병력은 분만 이후에 계속된다. 이러한 병력은 태반 또는 그로부터 수확된 단리된 태반 세포의 후속 사용을 조정하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 단리된 인간 태반 세포는, 병력에 비추어서, 태반과 관련된 영아 또는 영아의 부모, 형제자매 또는 기타 친척을 위한 개인화된 의약에 사용될 수 있다.

[0171] 단리된 태반 세포의 회수 전에, 제대 혈액 및 태반 혈액은 바람직하게는 제거된다. 특정 실시양태에서, 분만 이후에 태반 내의 제대혈을 회수한다. 통상적인 제대혈 회수 방법이 태반에 적용될 수 있다. 전형적으로, 바늘 또는 캐놀라를 사용하여 중력의 보조를 받아 태반을 방혈시킨다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,372,581 (Anderson); 미국 특허 번호 5,415,665 (Hessel et al.) 참조). 바늘 또는 캐놀라를 통상적으로 제대 정맥에 넣고, 태반으로부터 제대혈이 배출되는 것을 돕도록 태반을 부드럽게 마사지할 수 있다. 이러한 제대혈 회수는 상업적으로, 예를 들어 라이프뱅크 USA(LifeBank USA, 뉴저지주 시더 크놀)에서 수행할 수 있다. 바람직하게는, 제대혈 회수 동안의 조직 파괴를 최소화하도록 태반은 추가적인 조작 없이 중력에 의해 배출된다.

[0172] 전형적으로, 예를 들어 관류 또는 조직 해리에 의한 제대혈의 회수 및 줄기 세포의 수집을 위해, 태반은 분만실 또는 출산실에서 또 다른 장소, 예를 들어 실험실로 수송된다. 태반은 바람직하게는 멸균 단열 수송 장치 (태반의 온도를 20-28℃ 사이에서 유지시킴)에서 수송되고, 예를 들어 근위 제대를 집게로 집은 태반을 멸균 집-락(zip-lock) 플라스틱 백에 넣은 다음, 이를 단열 용기에 넣는다. 또 다른 실시양태에서, 실질적으로 계류 중인 미국 특허 번호 7,147,626에 기재된 바와 같이 제대혈 수집 키트 내에서 태반이 수송된다. 바람직하게는, 태반은 분만 후 4시간 내지 24시간 내에 실험실로 전달된다. 특정 실시양태에서, 근위 제대를 바람직하게는 태반 원반 내로의 삽입부의 4-5 cm (센티미터) 이내에서, 제대혈 회수 전에 집게로 집는다. 또 다른 실시양태에서, 근위 제대를 제대혈 회수 후에, 그러나 태반의 추가적인 프로세싱 전에 집게로 집는다.

[0173] 태반은 세포 수집 전에, 멸균 조건 하에 실온 또는 5℃ 내지 25℃의 온도에서 보관될 수 있다. 임의의 잔류 제대혈을 제거하기 위해 태반을 관류하기 전에 4시간 내지 24시간, 48시간 이하, 또는 48시간을 초과하는 시간의 기간 동안 태반이 보관될 수 있다. 한 실시양태에서, 만출 후 약 0시간 내지 약 2시간째에 태반이 수확된다. 태반은 바람직하게는 5℃ 내지 25℃의 온도에서 항응고제 용액 중에 보관된다. 적합한 항응고제 용액은 당업계에 널리 알려져 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와파린 나트륨 용액이 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액 (예를 들어, 1:1000 용액 중 1% w/w)을 포함한다. 방혈된 태반은 바람직하게는 36시간 이하 동안 보관된 후, 태반 세포가 수집된다.

[0174] 일단 일반적으로 상기와 같이 수집 및 제조되면, 포유동물 태반 또는 그의 일부분을 단리된 태반 세포를 수득하기 위해 임의의 당업계에 공지된 방식으로 처리할 수 있고, 예를 들어 관류시키거나 파괴할 수 있으며, 예를 들어 하나 이상의 조직 파괴 효소로 소화시킬 수 있다.

[0175] 5.3.3 태반 조직의 물리적 파괴 및 효소적 소화

[0176] 한 실시양태에서, 줄기 세포는 포유동물 태반으로부터 상기 기관의 일부분 또는 전체의 물리적 파괴에 의해 수득된다. 예를 들어, 태반 또는 그의 일부분을 예를 들어 압착하거나, 베어내거나, 다지거나, 주사위꼴로 자르거나, 잘게 자르거나, 침연시키는 것 등을 할 수 있다. 이어서, 조직을 배양하여 단리된 태반 세포의 집단을 수득할 수 있다. 전형적으로, 예를 들어 배양 배지, 염수 용액 또는 줄기 세포 수집 조성물을 사용하여 태반 조직을 파괴한다 (섹션 5.5.1 및 하기 참조).

[0177] 물리적 파괴 및/또는 효소적 소화 및 줄기 세포 회수 전에 태반을 구성성분들로 해부할 수 있다. 단리된 태반 세포는 전체 태반으로부터를 비롯하여, 양막, 융모막, 제대, 태반엽, 또는 이들의 임의의 조합물의 전체 또는 일부분으로부터 수득될 수 있다. 바람직하게는, 단리된 태반 세포는 양막 및 융모막을 포함하는 태반 조직으로부터 수득된다. 전형적으로, 단리된 태반 세포는 태반 조직의 소형 블록, 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 입방 밀리미터인 태반 조직의 블록의 파괴에 의해 수득될 수 있다. 임의의 물리적 파괴 방법이 사용될 수 있고, 단, 파괴 방법은 예를 들어 트리판 블루 배제에 의해 결정될 때, 상기 기관 내의 세포 중 다수, 보다 바람직하게는 대다수, 보다 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 생존성하도록 한다.

[0178] 일반적으로, 단리된 부착성 태반 세포는 태반 또는 그의 일부분으로부터 만출 후 처음 약 3일 이내의 임의의 시점에 수집될 수 있지만, 바람직하게는 만출 후 약 8시간 내지 약 18시간 사이에 수집한다.

[0179] 구체적 실시양태에서, 파괴된 조직은 단리된 태반 세포의 증식에 적합한 조직 배양 배지 중에서 배양된다 (예를

들어, 태반 세포, 예를 들어 PDAC의 배양을 기재하는 하기 섹션 5.6 참조).

- [0180] 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 하나 이상의 조직 소화 효소를 사용함으로써 달성될 수 있는 효소적 소화를 포함하는 태반 조직의 물리적 파괴에 의해 수집된다. 태반 또는 그의 일부분을 또한 물리적으로 파괴하고 하나 이상의 효소로 소화시킨 다음, 생성된 물질을 세포 수집 조성물에 침침시키거나, 세포 수집 조성물 내로 혼합시킬 수 있다.
- [0181] 바람직한 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직 파괴 효소(들)를 포함한다. 태반 조직을 파괴하는 데 사용될 수 있는 효소는 파파인, 데옥시리보뉴클레아제, 세린 프로테아제, 예컨대 트립신, 키모트립신, 콜라게나제, 디스파제 또는 엘라스타제를 포함한다. 세린 프로테아제는 혈청 내의 알파 2 마이크로글로불린에 의해 억제될 수 있고, 따라서 소화에 사용된 배지는 통상적으로 혈청이 없다. EDTA 및 DNase는 효소 소화 절차에서 통상적으로 사용되어 세포 회수의 효율을 증가시킨다. 점성 소화물 내에 세포가 포획되는 것을 피하도록 소화물은 바람직하게는 희석된다.
- [0182] 조직 소화 효소의 임의의 조합물이 사용될 수 있다. 트립신을 사용한 소화를 위한 전형적인 농도는 0.1% 내지 약 2% 트립신, 예를 들어 약 0.25% 트립신을 포함한다. 프로테아제는 조합되어, 즉 2가지 이상의 프로테아제가 동일한 소화 반응에서 사용될 수 있거나, 또는 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 및 태반 다능 세포를 유리시키기 위해 순차적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 태반 또는 그의 일부분은 먼저 약 1 내지 약 2 mg/ml의 적절한 양의 콜라게나제 I로 예를 들어 30분 동안 소화되고, 이어서 약 0.25% 농도의 트립신으로 예를 들어 10분 동안 37°C에서 소화된다. 바람직하게는 세린 프로테아제를 다른 효소의 사용에 이어서 연속적으로 사용한다.
- [0183] 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포 수집 조성물, 또는 줄기 세포 수집 조성물로의 줄기 세포의 단리 전에 조직이 파괴 및/또는 소화된 용액에 킬레이트, 예를 들어 에틸렌 글리콜 비스(2-아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 첨가함으로써 조직을 추가로 파괴할 수 있다.
- [0184] 소화 후, 소화물을 예를 들어 배양 배지로 3회 세척하고, 세척된 세포를 배양 플라스크 내로 시딩한다. 이어서, 세포를 차등 부착에 의해 단리하고, 예를 들어 생존율, 세포 표면 마커, 분화 등에 대해 특성화한다.
- [0185] 전체 태반, 또는 태아 및 모체 세포 둘 모두를 포함하는 태반의 일부분의 경우 (예를 들어, 태반의 일부분이 융모막 또는 태반엽을 함유하는 경우)에, 단리된 태반 세포가 태아 및 모체 공급원 둘 모두로부터 유래된 태반 세포의 혼합물을 포함할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 모체 세포를 포함하지 않거나 무시할 수 있는 개수의 모체 세포를 포함하는 태반의 일부분 (예를 들어, 양막)의 경우에, 이로부터 단리된 태반 세포는 거의 배타적으로 태아 태반 세포 (즉, 태아 유전자형을 갖는 태반 세포)를 포함할 것이다.
- [0186] 차등 트립신처리 (하기 섹션 5.3.5 참조)에 이어서, 1개 이상의 새로운 배양 용기에서 신선한 증식 배지 중에서 배양하는 것 (임의로 2차 차등 트립신처리 단계가 이어짐)에 의해 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기재된 태반 세포가 파괴된 태반 조직으로부터 단리될 수 있다.
- [0187] 5.3.4 태반 관류
- [0188] 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기재된 태반 세포를 또한 포유동물 태반의 관류에 의해 수득할 수 있다. 포유동물 태반을 관류하여 태반 세포를 수득하는 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,045,148 및 7,255,729 (Hariri), 및 미국 특허 출원 공보 번호 2007/0275362 및 2007/0190042에 개시되어 있고, 이들 각각의 개시내용은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.
- [0189] 예를 들어 관류 용액으로 세포 수집 조성물을 사용하여, 예를 들어 태반 혈관을 통한 관류에 의해 태반 세포를 수집할 수 있다. 한 실시양태에서, 제대 동맥과 제대 정맥 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 관류 용액을 통과시킴으로써 포유동물 태반이 관류된다. 태반을 통한 관류 용액의 흐름은 예를 들어 태반 내로의 중력 흐름을 사용하여 달성될 수 있다. 바람직하게는, 관류 용액을 펌프, 예를 들어 연동 펌프를 사용하여 태반을 통과하도록 밀어 넣는다. 예를 들어, 멸균 연결 장치, 예컨대 멸균 튜빙(tubing)에 연결된 캐놀라, 예를 들어 테플론(TEFLON)[®] 또는 플라스틱 캐놀라가 제대 정맥에 삽관될 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 매니폴드에 연결된다.
- [0190] 관류에 대비하여, 바람직하게는 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥이 태반의 최고점에 위치하는 방식으로 놓인다 (예를 들어, 매달린다). 태반 혈관계 및 주변 조직에 관류 유체를 통과시킴으로써 태반이 관류될 수 있다. 관류 유체를 제대 정맥에 통과시키고 제대 동맥으로부터 수집함으로써, 또는 관류 유체를 제대 동맥에 통과시키고

제대 정맥으로부터 수집함으로써, 태반이 또한 관류될 수 있다.

- [0191] 예를 들어, 한 실시양태에서, 예를 들어 가요성 연결부를 통해 관류 용액의 저장소에 연결된 피펫에, 제대 동맥 및 제대 정맥이 동시에 연결된다. 관류 용액이 제대 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액이 태반의 주변 조직 내로 혈관의 벽으로부터 삼출되고/되거나 이러한 벽을 통과하고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적절한 개방형 용기에 수집된다. 또한 관류 용액이 제대 개구부를 통해 도입되어, 모체의 자궁 벽과 계면한 태반의 벽 내의 개구부에서 흘러 나오거나 스며나오게 될 수 있다. "팬(pan)" 방법으로 칭할 수 있는 상기 방법에 의해 수집되는 태반 세포는 일반적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.
- [0192] 또 다른 실시양태에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하여 제대 동맥으로부터 수집되거나, 또는 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로" 방법으로 칭할 수 있는 상기 방법에 의해 수집되는 태반 줄기 세포는 일반적으로 거의 전적으로 태아 세포이다.
- [0193] 팬 방법을 사용하는 관류, 즉 관류액이 태반의 모체 측면으로부터 삼출된 후 수집되는 관류로 태아 및 모체 세포의 혼합물이 생성된다는 것이 이해될 것이다. 그 결과, 이러한 방법에 의해 수집된 세포는 태아 및 모체 기원 둘 모두의 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포의 혼합 집단을 포함할 수 있다. 반면에, 관류 유체가 1개 또는 2개의 태반 혈관을 통과하고 오직 나머지 혈관(들)만을 통하여 수집되는, 태반 혈관 계만을 통과한 폐쇄 회로 방법의 관류에서는 거의 배타적으로 태아 기원의 태반 세포의 집단이 수집된다.
- [0194] 한 실시양태에서, 폐쇄 회로 관류 방법이 하기와 같이 수행될 수 있다. 산후 태반을 출산 후 약 48시간 이내에 수득하였다. 제대를 집게로 잡고, 집게 위로 절단한다. 제대는 폐기할 수 있거나, 또는 예를 들어 제대 줄기 세포를 회수하기 위해 및/또는 생체재료의 생산을 위해 제대 막을 프로세싱하기 위해 프로세싱할 수 있다. 양막은 관류 동안 유지될 수 있거나, 또는, 예를 들어 손가락으로의 비절개 박리를 사용하여, 용모막으로부터 분리될 수 있다. 양막이 관류 전에 용모막으로부터 분리되는 경우에, 이는 예를 들어 폐기될 수 있거나 또는 프로세싱될 수 있고, 예를 들어 효소에 의한 소화에 의해 줄기 세포를 수득하기 위해, 또는 예를 들어 양막 생체재료, 예를 들어 미국 출원 공보 번호 2004/0048796 (그의 개시내용은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 생체재료를 생산하기 위해, 프로세싱될 수 있다. 모든 가시성 혈병 및 잔류 혈액을, 예를 들어 멸균 거즈를 사용하여 태반에서 청소한 후, 예를 들어 제대 막을 부분적으로 절단하여 제대의 단면을 노출시킴으로써, 제대 혈관을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들어 단힌 악어입 집계를 각각의 혈관의 절단 끝부분을 통해 전진시킴으로써 개방시킨다. 이어서, 관류 기구 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 튜빙과 같은 장치를 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적절한 임의의 펌프, 예를 들어 연동 펌프일 수 있다. 이어서, 멸균 수집 저장소, 예를 들어 250 mL 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입한다. 대안적으로, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입하고, 수집 저장소(들)에 대한 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 양쪽 모두에 삽입한다. 이어서, 태반에 다량의 관류 용액, 예를 들어 약 750 mL의 관류 용액을 관류한다. 이어서, 관류액 내의 세포를, 예를 들어 원심분리에 의해 수집한다. 특정 실시양태에서, 관류 용액, 예를 들어 100-300 mL 관류 용액을 태반에 관류하여 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 및/또는 태반 다능 세포를 수집하기 위한 관류 전에 잔류 혈액을 제거한다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포를 수집하기 위한 관류 전에 잔류 혈액을 제거하기 위해 관류 용액이 태반에 관류되지 않는다.
- [0195] 한 실시양태에서, 근위 제대를 관류 동안 집게로 잡고, 더욱 바람직하게는 태반 원반 내로의 제대의 삽입부의 4-5 cm (센티미터)이내에서 집게로 잡는다.
- [0196] 방혈 과정 동안 포유동물 태반으로부터의 관류 유체의 1차 수집물은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반혈의 잔류 적혈구의 색을 띤다. 관류가 진행되고 잔류 제대혈 세포가 태반으로부터 세척됨에 따라 관류 유체는 더욱 무색이게 된다. 일반적으로, 30 내지 100 mL (밀리리터)의 관류 유체가 처음에 태반을 방혈시키는 데 적절하지만, 관찰된 결과에 따라 더 많거나 더 적은 관류 유체가 사용될 수 있다.
- [0197] 태반 세포를 단리하는 데 사용된 관류 액체의 부피는 수집되는 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반에서 이루어질 수집 횟수 등에 따라 변할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 관류 액체의 부피는 50 mL 내지 5000 mL, 50 mL 내지 4000 mL, 50 mL 내지 3000 mL, 100 mL 내지 2000 mL, 250 mL 내지 2000 mL, 500 mL 내지 2000 mL, 또는 750 mL 내지 2000 mL일 수 있다. 전형적으로, 태반은 방혈 후 700-800 mL의 관류 액체로 관류된다.
- [0198] 태반을 수 시간 또는 수 일에 걸쳐 여러 번 관류할 수 있다. 태반을 다수회 관류시켜야 하는 경우에, 이를 멸균 조건 하에 용기 또는 다른 적합한 수납기 내에 유지하거나 배양하고, 세포 수집 조성물 또는 표준 관류 용액 (예를 들어, 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와파린 나트륨, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)를 함유하거나 함유하

지 않고/거나 항미생물제 (예를 들어, β -메르캅토에탄올 (0.1 mM)); 항생제, 예컨대 스트렙토마이신 (예를 들어, 40-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 페니실린 (예를 들어, 40 U/ml), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함유하거나 함유하지 않는 생리 염수 용액, 예를 들어 포스페이트 완충 염수 ("PBS"))으로 관류시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 관류 및 관류액의 수집 전에 태반이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간, 또는 2 또는 3일 또는 그 초과 동안 유지 또는 배양되도록, 단리된 태반을 관류액을 수집하지 않으면서 일정 기간 동안 유지 또는 배양한다. 관류된 태반은 1회 이상의 추가적인 시간(들) 동안, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24시간, 또는 그 초과 동안 유지된 후, 예를 들어 700-800 mL의 관류 유체로 2번째로 관류될 수 있다. 태반은 1, 2, 3, 4, 5회 또는 그 초과로 관류될 수 있고, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 관류될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 유핵 세포의 개수가 100개 세포/mL 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 상이한 시점의 관류액들을 개별적으로 추가로 프로세싱하여, 시간-의존적인 세포, 예를 들어 줄기 세포의 집단을 회수할 수 있다. 상이한 시점으로부터의 관류액들을 또한 모을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 만출 후 약 8 내지 약 18시간 사이에 태반 세포가 한번에 또는 여러 번 수집된다.

[0199] 바람직하게는, 상기 용액으로 관류되지 않았고, 태반 세포를 수득하도록 다른 방식 (예를 들어, 조직 파괴, 예를 들어 효소적 소화)으로 처리되지도 않은 포유동물 태반으로부터 수득가능한 개수보다 유의하게 더 많은 태반 세포가 관류로 수집된다. 이러한 상황에서, "유의하게 더 많은"은 10% 이상 더 많은 것을 의미한다. 예를 들어, 태반 또는 그의 일부분이 배양된 배양 배지로부터 수득가능한 태반 세포의 개수보다 유의하게 더 많은 태반 세포가 관류로 산출된다.

[0200] 하나 이상의 프로테아제 또는 기타 조직 파괴성 효소를 포함하는 용액으로의 관류에 의해 태반으로부터 태반 세포가 단리될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 태반 또는 그의 일부분 (예를 들어, 양막, 양막 및 융모막, 태반 소엽 또는 태반엽, 제대, 또는 임의의 상기의 것들의 조합)을 25-37°C로 만들고, 하나 이상의 조직 파괴성 효소와 함께 200 mL의 배양 배지에서 30분 동안 인큐베이션한다. 관류액으로부터의 세포를 수집하고, 4°C로 만들고, 5 mM EDTA, 2 mM 디티오프레이트 및 2 mM 베타-메르캅토에탄올을 포함하는 저온 억제제 혼합물로 세척한다. 수 분 후 태반 세포를 저온 (예를 들어, 4°C)의 줄기 세포 수집 조성물로 세척한다.

[0201] 5.3.5 태반 세포의 단리, 분류 및 특성화

[0202] 관류에 의해 또는 물리적 파괴, 예를 들어 효소에 의한 소화에 의해 수득되었는지 여부와 관계 없이, 단리된 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기재된 세포를 먼저 피콜(Ficoll) 농도구배 원심분리에 의해 다른 세포로부터 정제 (즉, 단리)할 수 있다. 이러한 원심분리는 원심분리 속도 등에 대해 임의의 표준 프로토콜을 따를 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어 태반으로부터 수집된 세포가 실온에서 15분 동안의 5000 x g의 원심분리에 의해 관류액으로부터 회수되고, 이는 세포를 예를 들어 오염성 잔해물 및 혈소판으로부터 분리한다. 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액을 약 200 mL로 농축하고, 부드럽게 피콜 상에 층상화하고, 22°C에서 20분 동안 약 1100 x g로 원심분리하여, 세포의 저밀도 계면층을 추가적인 프로세싱을 위해 수집한다.

[0203] 세포 펠렛이 신선한 줄기 세포 수집 조성물, 또는 세포 유지, 예를 들어 줄기 세포 유지에 적절한 배지, 예를 들어 2U/mL 헤파린 및 2 mM EDTA (길코BRL, NY)를 함유하는 IMDM 혈청 무함유 배지에 재현탁될 수 있다. 예를 들어, 림포프렙(Lymphoprep) (니코메드 파마(Nycomed Pharma, 노르웨이 오슬로))을 제조사의 권장 절차에 따라 사용하여 총 단핵 세포 분획을 단리할 수 있다.

[0204] 관류 또는 소화에 의해 수득된 태반 세포를, 예를 들어 추가로 또는 처음에, 0.2% EDTA를 함유한 0.05% 트립신 용액 (시그마, 미주리주 세인트 루이스)을 예를 들어 사용하는 차등 트립신처리에 의해 단리할 수 있다. 조직 배양 플라스틱-부착성인 단리된 태반 세포는 플라스틱 표면으로부터 약 5분 이내에 전형적으로 탈착되는 반면, 기타 부착성 집단은 20-30분을 초과하는 인큐베이션을 전형적으로 필요로 하기 때문에 차등 트립신처리가 가능하다. 트립신처리 및 트립신 중화 (예를 들어, 트립신 중화 용액 (TNS, 캄브렉스(Cambrex))) 등을 이용) 후에, 탈착된 태반 세포를 수확할 수 있다. 부착 세포를 단리하는 한 실시양태에서, 예를 들어 약 $5-10 \times 10^6$ 개 세포의 분취량을 여러 T-75 플라스크, 바람직하게는 피브로넥틴이 코팅된 T-75 플라스크 각각에 담는다. 이러한 실시양태에서, 세포를 시판되는 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM) (캄브렉스)와 함께 배양하고, 조직 배양 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂) 내에 놓을 수 있다. 10-15일 후, PBS로 세척함으로써 비-부착 세포를 플라스크로부터 제거한다. 이어서, PBS를 MSCGM으로 교체한다. 바람직하게는 플라스크를 각종 부착 세포 유형의 존재에 대해,

특히 섬유모세포 모양 세포의 클러스터의 확인 및 확장에 대해 매일 검사한다.

[0205] 포유동물 태반으로부터 수집된 세포의 수 및 유형을, 예를 들어 유동 세포측정법, 세포 분류, 면역세포화학 (예를 들어, 조직 특이적 또는 세포 마커 특이적 항체로의 염색), 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 자기 활성화 세포 분류 (MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하여 형태학 및 세포 표면 마커에서의 변화를 측정하는 것에 의해, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하는 세포 형태학의 검사에 의해, 및/또는 당업계에 공지된 기술, 예컨대 PCR 및 유전자 발현 프로파일링을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정하는 것에 의해, 모니터링할 수 있다. 이러한 기술들은 하나 이상의 특정 마커에 대해 양성인 세포들을 확인하는 데 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, CD34에 대한 항체를 사용하여, 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는지 여부를 상기의 기술을 사용하여 결정할 수 있고; 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는 경우에, 세포는 CD34⁺이다. 마찬가지로, RT-PCR에 의해 검출될 수 있기에 충분한 OCT-4 RNA 또는 성체 세포보다 유의하게 더 많은 OCT-4 RNA를 세포가 생산하는 경우에, 세포는 OCT-4⁺이다. 세포 표면 마커 (예를 들어, CD34와 같은 CD 마커)에 대한 항체, 및 OCT-4와 같은 줄기 세포-특이적 유전자의 서열이 당업계에 공지되어 있다.

[0206] 태반 세포, 특히 피콜 분리, 차등 부착 또는 이들의 조합에 의해 분리된 세포를 형광 활성화 세포 분류기 (FACS)를 사용하여 분류할 수 있다. 형광 활성화 세포 분류 (FACS)는 입자의 형광 성질을 기초로 하는, 세포가 포함되는 입자를 분리하기 위한 공지된 방법이다 (문헌 [Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165]). 개별적인 입자들 내의 형광 모이어티의 레이저 여기로 작은 전하가 발생하여, 혼합물로부터 양성 입자와 음성 입자가 전자기적으로 분리되도록 한다. 한 실시양태에서, 세포 표면 마커-특이적 항체 또는 리간드가 상이한 형광 표지로 표지된다. 세포가 세포 분류기를 통해 프로세싱되어, 사용된 항체에 결합하는 능력을 기초로 세포가 분리된다. FACS로 분류된 입자들이 96-웰 또는 384-웰 플레이트의 개별적인 웰 내로 직접 침착되어, 분리 및 클로닝을 용이하게 할 수 있다.

[0207] 한 세포 분류 계획에서, 태반으로부터의 세포, 예를 들어 PDAC가, 예를 들어 마커 CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 및/또는 HLA-G 중 하나 이상의 발현을 기초로 분류된다. 이는 배양 시의 세포의 부착 성질을 기초로 이러한 세포를 선택하는 절차와 함께 이루어질 수 있다. 예를 들어, 조직 배양 플라스틱 부착 선택이 마커 발현을 기초로 하는 분류 전 또는 후에 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어 먼저 세포가 CD34의 발현을 기초로 분류되고; CD34⁻ 세포가 유지되고, 추가적으로 CD200⁺ 및 HLA-G⁻인 CD34⁻ 세포가 모든 다른 CD34⁻ 세포로부터 분리된다. 또 다른 실시양태에서, 태반으로부터의 세포가 마커 CD200 및/또는 HLA-G의 발현을 기초로 분류되고; 예를 들어, CD200을 디스플레이하고 HLA-G가 결여된 세포가 추가적인 사용을 위해 분리된다. 구체적 실시양태에서, 예를 들어 CD200을 발현하고/거나 예를 들어 HLA-G가 결여된 세포가 CD73 및/또는 CD105의 발현, 또는 항체 SH2, SH3 또는 SH4가 인식하는 에피토프의 발현, 또는 CD34, CD38 또는 CD45의 발현 결여를 기초로 추가로 분류될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는 CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 및 CD45의 발현 또는 발현 결여에 의해 분류되고, CD200⁺, HLA-G⁻, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻인 태반 세포가 추가 사용을 위해 다른 태반 세포들로부터 분리된다.

[0208] 분류된 태반 세포의 임의의 상기 실시양태의 구체적 실시양태에서, 분류 후 남아 있는 세포 집단 내의 세포의 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상이 상기 분리된 태반 세포이다. 상기 섹션 5.2.2에 기재된 임의의 마커들 중 하나 이상에 의해 태반 세포가 분류될 수 있다.

[0209] 구체적 실시양태에서, 예를 들어 (1) 조직 배양 플라스틱에 부착성이고, (2) CD10⁺, CD34⁻ 및 CD105⁺인 태반 세포는 다른 태반 세포로부터 분류된다 (즉, 분리된다). 또 다른 구체적 실시양태에서, (1) 조직 배양 플라스틱에 부착성이고, (2) CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ 및 CD200⁺인 태반 세포는 다른 태반 세포로부터 분류된다 (즉, 분리된다). 또 다른 구체적 실시양태에서, (1) 조직 배양 플라스틱에 부착성이고, (2) CD10⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺인 태반 세포는 다른 태반 세포로부터 분류된다 (즉, 분리된다).

[0210] 태반 세포의 뉴클레오티드 서열-기반 검출에 대해, 본원에 수록된 마커의 서열은 공공 데이터베이스, 예컨대 진뱅크 또는 EMBL에서 쉽게 이용가능하다.

[0211] 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포의 항체-매개 검출 및 분류와 관련하여, 특정 마커에 대해 특이적인 임의의 항체를 세포의 검출 및 분류 (예를 들어, 형광-활성화 세포 분류)에 적절한 임의의 형광

단 또는 기타 표지와 조합하여 사용할 수 있다. 특이적 마커에 대한 항체/형광단 조합물은 HLA-G에 대한 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 접합된 모노클로날 항체 (세로텍(Serotec, 노스 캐롤라이나주 랄레이)으로부터 입수가가능함); CD10 (BD 이뮤노시토크메트리 시스템즈(BD Immunocytometry Systems, 캘리포니아주 산호세)로부터 입수가가능함), CD44 (BD 바이오사이언시스 파밍겐(BD Biosciences Pharmingen, 캘리포니아주 산호세)로부터 입수가가능함), 및 CD105 (알앤디 시스템즈 인크. (미네소타주 미네아폴리스)로부터 입수가가능함); CD44, CD200, CD117 및 CD13에 대한 피코에리트린 (PE) 접합된 모노클로날 항체 (BD 바이오사이언시스 파밍겐); CD33 및 CD10에 대한 피코에리트린-Cy7 (PE Cy7) 접합 모노클로날 항체 (BD 바이오사이언시스 파밍겐); CD38에 대한 알로피코시아닌 (APC) 접합 스트렙타비딘 및 모노클로날 항체 (BD 바이오사이언시스 파밍겐); 및 비오닐틸화 CD90 (BD 바이오사이언시스 파밍겐)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 기타 항체는 CD133-APC (밀테니(Miltenyi)), KDR-비오틴 (CD309, 아브캄(Abcam)), 시토케라틴K-Fitc (시그마 또는 다코(Dako)), HLA ABC-Fitc (BD), HLA DR,DQ,DP-PE (BD), β -2-마이크로글로불린-PE (BD), CD80-PE (BD) 및 CD86-APC (BD)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 다른 항체/표지 조합물은 CD45-PerCP (페리딘 클로로필 단백질); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (플루오레세인); HLA-G-F 및 7-아미노-악티노마이신-D (7-AAD); HLA-ABC-F 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 목록은 포괄적인 것이 아니고, 다른 공급처로부터의 다른 항체도 상업적으로 입수가가능하다.

[0212] 본원에 제공된 단리된 태반 세포는, 예를 들어 CD117 또는 CD133에 대한 피코에리트린-Cy5 (PE Cy5) 접합 스트렙타비딘 및 비오틴 접합 모노클로날 항체를 사용하여 CD117 또는 CD133에 대해 검정될 수 있지만; 상기 시스템을 사용하여, 세포는 비교적 높은 배경 때문에 각각 CD117 또는 CD133에 대해 양성으로 보일 수 있다.

[0213] 단리된 태반 세포가 단일 마커에 대한 항체로 표지되어, 검출 및 분류될 수 있다. 또한 태반 세포가 상이한 마커들에 대한 여러 항체로 동시에 표지될 수 있다.

[0214] 또 다른 실시양태에서, 자기 비드를 사용하여 세포를 분리할 수 있다. 자기 비드 (직경 0.5-100 μ m)에 결합하는 능력을 기초로 입자를 분류하는 방법인 자기 활성화 세포 분류 (MACS)를 사용하여 세포들을 분류할 수 있다. 특정 세포 표면 분자 또는 합텐을 특이적으로 인식하는 항체를 공유 결합으로 부가하는 것을 포함하여, 다양한 유용한 변형을 자기 마이크로구체에 수행할 수 있다. 그후, 비드가 세포와 혼합되어 결합이 허용된다. 그후, 세포를 자기장에 통과시켜, 특정 세포 표면 마커가 있는 세포를 분리해 낸다. 한 실시양태에서, 이어서 이러한 세포들을 단리하고, 추가적인 세포 표면 마커에 대한 항체에 커플링된 자기 비드와 다시 혼합한다. 세포를 자기장에 다시 통과시켜, 양쪽 항체에 결합한 세포를 단리한다. 그후, 이러한 세포를 별도의 접시, 예컨대 클론성 단리를 위한 미량역가 접시 내로 회석할 수 있다.

[0215] 단리된 태반 세포를 세포 형태학 및 성장 특성을 기초로 또한 특성화 및/또는 분류할 수 있다. 예를 들어, 단리된 태반 세포가, 예를 들어 배양 시 섬유모세포 모양의 외관을 갖는 것으로 특성화되고/되거나 이러한 외관을 기초로 선택될 수 있다. 또한 단리된 태반 세포는 배아-유사체를 형성하는 능력이 있는 것으로 특성화되고/되거나 이러한 능력을 기초로 선택될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 섬유모세포 모양의 형상이고, CD73 및 CD105를 발현하며, 배양시 하나 이상의 배아-유사체를 형성하는 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, 배양시 하나 이상의 배아-유사체를 생산하는 OCT-4⁺ 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 단리된다.

[0216] 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포가 콜로니 형성 단위 검정에 의해 확인 및 특성화될 수 있다. 콜로니 형성 단위 검정은 메센컬트(MESENCLT)TM 배지 (스템 셀 테크놀로지스, 인크.(Stem Cell Technologies, Inc., 브리티쉬 콜럼비아 밴쿠버))와 같이 당업계에 통상적으로 공지되어 있다.

[0217] 단리된 태반 세포는 당업계에 공지된 표준 기술, 예를 들어 트리판 블루 배제 검정, 플루오레세인 디아세테이트 흡수 검정, 프로피듐 아이오다이드 흡수 검정 (생존력을 평가하기 위해); 및 티미딘 흡수 검정 또는 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 세포 증식 검정 (증식을 평가하기 위해)을 이용하여 생존력, 증식 가능성, 및 수명에 대해 평가할 수 있다. 당업계에 공지된 방법에 의해, 예컨대 확장 배양 시 집단 배가의 최대값을 결정함으로써, 수명을 결정할 수 있다.

[0218] 단리된 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기재된 단리된 태반 세포가 당업계에 공지된 기타 기술, 예를 들어 원하는 세포의 선택적 성장 (양성 선택), 원치 않는 세포의 선택적 파괴 (음성 선택); 예를 들어 대두 응집소와의 혼합 집단 내에서의 차별적인 세포 응집성을 기초로 하는 분리; 냉동-해동 절차; 여과; 통상적 및 구역 원심분리; 원심분리성 정제 (카운터-스트리밍 원심분리); 단위 중량 분리; 역류 분배; 전기 영동 등을 사용

하여 다른 태반 세포로부터 또한 분리될 수 있다.

[0219]

5.4 분리된 태반 세포의 배양

[0220]

5.4.1 배양 배지

[0221]

분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단, 또는 태반 세포가 성장해 나오는 세포 또는 태반 조직을 사용하여 세포 배양을 시작하거나 시딩할 수 있다. 일반적으로 세포는 세포의 매트릭스 또는 리간드, 예컨대 라미닌, 콜라겐 (예를 들어, 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴, 폴리리신, 셀스타트 (CELLSTART)TM, 및/또는 세포의 막 단백질 (예를 들어, 매트릭셀®, BD 디스커버리 랩웨어, 매사추세츠주 베드포드), 또는 다른 적합한 생체물질 또는 합성 모방체 작용제로 코팅되거나 코팅되지 않은 멸균 조직 배양 용기로 옮겨진다.

[0222]

분리된 태반 세포는 당업계에서 세포, 예를 들어 줄기 세포의 배양에 허용되는 것으로 인식되는 임의의 배지 및 임의의 조건에서 배양될 수 있다. 바람직하게는, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 분리된 태반 세포는, 예를 들어 ITS (인슐린-트랜스페린-셀레늄), LA+BSA (리놀레산-소 혈청 알부민), 텍사메타손 L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-1, 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM-LG (둘베코(Dulbecco) 변형 필수 배지, 저-글루코스)/MCDB 201 (병아리 섬유모세포 기초 배지); 10% 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 DMEM-HG (고-글루코스); 15% FBS를 포함하는 DMEM-HG; 10% FBS, 10% 말 혈청, 및 히드로코르티손을 포함하는 IMDM (이스코브(Iscove) 변형 둘베코 배지); 1% 내지 20% FBS, EGF, 및 헤파린을 포함하는 M199; 10% FBS, 글루타맥스(GLUTAMAX)TM 및 겐타미신을 포함하는 α-MEM (최소 필수 배지); 10% FBS, 글루타맥스TM 및 겐타미신을 포함하는 DMEM 등에서 배양될 수 있다.

[0223]

태반 세포를 배양하는 데 사용될 수 있는 다른 배지는 DMEM (고 또는 저 글루코스), 이글 기초 배지, 햄(Ham) F10 배지 (F10), 햄 F-12 배지 (F12), 이스코브 변형 둘베코 배지, 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM), 라이보비츠(Liebovitz) L-15 배지, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, 개선된 DMEM (깁코), DMEM/MCDB201 (시그마), 및 셀-그로 프리(CELL-GRO FREE)를 포함한다.

[0224]

예를 들어, 혈청 (예를 들어, 태아 소 혈청 (FBS), 바람직하게는 약 2-15% (v/v); 말 혈청 (ES); 인간 혈청 (HS)); 베타-메르캅토에탄올 (BME), 바람직하게는 약 0.001% (v/v); 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), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 및 에리트로포이에틴 (EPO); 아미노산, 예를 들어 L-발린; 및 미생물 오염을 제어하기 위한 하나 이상의 항생제 및/또는 항진균제, 예컨대, 페니실린 G, 스트렙토마이신 술페이트, 암포테리신 B, 겐타미신, 및 니스타틴을 비롯한 하나 이상의 성분이 단독으로 또는 함께 조합되어 배양 배지를 보충할 수 있다.

[0225]

분리된 태반 세포는 표준 조직 배양 조건에서, 예를 들어 조직 배양 접시 또는 멀티웰 플레이트에서 배양될 수 있다. 현적 방법을 사용하여 분리된 태반 세포가 또한 배양될 수 있다. 이러한 방법에서, 분리된 태반 세포가 약 5 mL의 배지 내에 약 1×10^4 개 세포/mL로 현탁되고, 1개 이상의 배지 액적이 조직 배양 용기, 예를 들어 100 mL 페트리 접시의 뚜껑의 내부에 놓인다. 상기 소적은, 예를 들어 단일 소적이거나, 또는 예를 들어 다중 채널 피펫터로부터의 다수의 소적일 수 있다. 뚜껑을 조심스럽게 뒤집고, 다량의 액체, 예를 들어 접시 대기 내의 수분 함량을 유지하는 데 충분한 멸균 PBS를 함유하는 접시 바닥 위에 놓고, 줄기 세포를 배양한다.

[0226]

한 실시양태에서, 분리된 태반 세포는 분리된 태반 세포에서 미분화 표현형을 유지하는 작용을 하는 화합물의 존재 하에 배양된다. 구체적 실시양태에서, 화합물은 치환된 3,4-디히드로피리미돌[4,5-d]피리미딘이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 화합물은 하기 화학 구조를 갖는 화합물이다:



[0227]

[0228]

이러한 화합물은 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단과, 예를 들어 약 1 μM 내지 약 10 μM 사이의 농도로 접촉될 수 있다.

[0229] 5.4.2 태반 세포의 확장 및 증식

[0230] 일단 분리된 태반 세포, 또는 분리된 태반 세포의 집단 (예를 들어, 생체 내에서 줄기 세포 또는 줄기 세포 집단과 정상적으로 회합되는 태반 세포의 50% 이상으로부터 분리된 태반 세포 또는 태반 세포 집단)이 수득되면, 이러한 세포 또는 세포의 집단이 시험관 내에서 증식 및 확장될 수 있다. 예를 들어, 분리된 태반 세포의 집단이 조직 배양 용기, 예를 들어 접시, 플라스크, 멀티웰 플레이트 등에서, 세포가 70-90% 전면배양물로 증식하는데 충분한 시간 동안, 즉 세포 및 그의 자손이 조직 배양 용기의 배양 표면적의 70-90%를 차지할 때까지 배양될 수 있다.

[0231] 분리된 태반 세포가 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 시딩될 수 있다. 예를 들어, 세포는 저밀도 (예를 들어, 약 1,000개 내지 약 5,000개 세포/cm²) 내지 고밀도 (예를 들어, 약 50,000개 이상의 세포/cm²)로 시딩될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 공기 중 약 0 내지 약 5 부피%의 CO₂ 존재 하에 배양된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 세포는 공기 중 약 2 내지 약 25%의 O₂, 바람직하게는 공기 중 약 5 내지 약 20%의 O₂에서 배양된다. 세포는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 40℃, 바람직하게는 37℃에서 배양된다. 바람직하게는 세포는 인큐베이터에서 배양된다. 배양 배지는 정적일 수 있거나, 또는 예를 들어 생물반응기를 사용하여 교반될 수 있다. 바람직하게는, 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 낮은 산화성 스트레스 하에 성장된다 (예를 들어, 글루타티온, 아스코르브산, 카탈라제, 토코페롤, N-아세틸시스테인 등이 첨가됨).

[0232] 일단 100% 미만, 예를 들어 70% 내지 90% 전면배양물이 수득되면, 세포가 계대배양될 수 있다. 예를 들어, 세포를 당업계에 널리 공지된 기술을 사용하여 효소로 처리하여, 예를 들어 트립신처리하여, 조직 배양 표면으로부터 세포를 분리할 수 있다. 세포를 피펫팅에 의해 제거하고 세포를 계수한 후, 약 10,000-100,000개 세포/cm²가 신선한 배양 배지를 함유하는 새로운 배양 용기로 계대배양된다. 전형적으로, 새로운 배지는 분리된 태반 세포가 제거된 배지와 동일한 유형이다. 분리된 태반 세포는 대략, 최소, 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 또는 20, 또는 그 초과로 계대배양될 수 있다.

[0233] 5.4.3 분리된 태반 세포의 집단

[0234] 또한, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기재된 분리된 태반 세포의 집단이 본원에 제공된다. 분리된 태반 세포의 집단은 하나 이상의 태반으로부터 직접적으로 분리될 수 있고; 즉, 세포 집단은 관류액으로부터 수득되거나 관류액 내에 함유된, 또는 파괴된 태반 조직, 예를 들어 태반 조직 소화물 (즉, 태반 또는 그의 일부분의 효소에 의한 소화에 의해 수득된 세포들의 수집물)로부터 수득되거나 이러한 소화물 내에 함유된 분리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단일 수 있다. 본원에 기재된 분리된 태반 세포가 또한 배양 및 확장되어 분리된 태반 세포의 집단이 생산될 수 있다. 분리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 또한 배양 및 확장되어 태반 세포 집단이 생산될 수 있다.

[0235] 본원에 제공된 치료 방법에 유용한 태반 세포 집단은 분리된 태반 세포, 예를 들어 본원의 섹션 5.4.2에 기재된 분리된 태반 세포를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 태반 세포 집단 내의 세포의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상이 분리된 태반 세포이다. 즉, 분리된 태반 세포의 집단은, 예를 들어 많게는 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 분리된 태반 세포가 아닌 세포를 포함할 수 있다.

[0236] 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 분리된 태반 세포 집단은, 예를 들어 특정 마커 및/또는 특정 배양 또는 형태 특성을 발현하는, 효소적 소화 또는 관류로부터 유래된 분리된 태반 세포를 선택함으로써 생성될 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어 (a) 기관에 부착하고, (b) CD200을 발현하고 HLA-G의 발현이 결여된 태반 세포를 선택하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성하는 단계를 포함하는 세포 집단의 생산 방법이 본원에 제공된다. 또 다른 실시양태에서, CD200을 발현하고 HLA-G의 발현이 결여된 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, (a) 기관에 부착하고, (b) CD73, CD105, 및 CD200을 발현하는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, CD73, CD105 및 CD200을 발현하는 태반 세포를 확인하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) CD200 및 OCT-4를 발현하는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형

성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, CD200 및 OCT-4를 발현하는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, (a) 기관에 부착하고, (b) CD73 및 CD105를 발현하며, (c) 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우에 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, CD73 및 CD105를 발현하고, 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우에 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, (a) 기관에 부착하고, (b) CD73 및 CD105를 발현하고 HLA-G의 발현이 결여된 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, CD73 및 CD105를 발현하고 HLA-G의 발현이 결여된 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단의 생산 방법은 (a) 기관에 부착하고, (b) OCT-4를 발현하며, (c) 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 태반 세포를 선택하는 단계; 및 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시키는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, OCT-4를 발현하며, 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양되는 경우 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다.

[0237] 또 다른 실시양태에서, (a) 기관에 부착하고, (b) CD10 및 CD105를 발현하고 CD34를 발현하지 않는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, CD10 및 CD105를 발현하고 CD34를 발현하지 않는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, (a) 기관에 부착하고, (b) CD10, CD105 및 CD200을 발현하고 CD34를 발현하지 않는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 실시양태에서, CD10, CD105 및 CD200을 발현하고 CD34를 발현하지 않는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, (a) 기관에 부착하고, (b) CD10, CD90, CD105 및 CD200을 발현하고 CD34 및 CD45를 발현하지 않는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, CD10, CD90, CD105 및 CD200을 발현하고 CD34 및 CD45를 발현하지 않는 태반 세포를 선택하고, 상기 세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포 집단을 형성시킴으로써 세포 집단이 생산된다.

[0238] 상기 섹션 5.2.2에 기재된 임의의 마커 조합을 갖는 태반 세포를 포함하는 선택된 세포 집단은 유사한 방식으로 분리되거나 얻을 수 있다.

[0239] 임의의 상기 실시양태에서, 분리된 세포 집단의 선택은 ABC-p (태반-특이적 ABC 전달체 단백질; 예를 들어, 문헌 [Allikmets et al., Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)] 참조)를 발현하는 태반 세포를 선택하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 중간엽 줄기 세포에 대해 특이적인 하나 이상의 특성, 예를 들어 CD44의 발현, CD90의 발현, 또는 상기의 것들의 조합 발현을 나타내는 세포를 선택하는 단계를 또한 포함할 수 있다.

[0240] 상기 실시양태들에서, 기관은 세포, 예를 들어 분리된 태반 세포의 배양 및/또는 선택이 달성될 수 있는 임의의 표면일 수 있다. 전형적으로, 기질은 플라스틱, 예를 들어 조직 배양 접시 또는 멀티웰 플레이트 플라스틱이다. 조직 배양 플라스틱은 생체분자, 예를 들어 라미닌 또는 피브로넥틴으로 코팅될 수 있다.

[0241] 세포, 예를 들어 분리된 태반 세포는 세포 선택 분야에 공지된 임의의 수단에 의해 태반 세포 집단에 대해 선택될 수 있다. 예를 들어, 세포는 예를 들어 유동 세포분리법 또는 FACS에서 하나 이상의 세포 표면 마커에 대한 항체 또는 항체들을 이용하여 선택될 수 있다. 선택은 자기 비드와 함께 항체를 사용하여 달성할 수 있다. 특정 줄기 세포-관련 마커에 특이적인 항체는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, OCT-4 (아브캄, 미국 매사추세츠주 캄브리지), CD200 (아브캄), HLA-G (아브캄), CD73 (BD 바이오사이언시즈 파밍겐, 미국 캘리포니아주 샌디에고), CD105 (아브캄; 바이오디자인 인터내셔널(BioDesign International, 미국 메인주 사코)) 등에 대한 항체가 이용가능하다. 다른 마커에 대한 항체도 또한 상업적으로 이용가능하고, 예를 들어 CD34, CD38 및 CD45에 대한 항체는 예를 들어, 스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies) 또는 바이오디자인 인터내셔널로부터

입수가능하다.

- [0242] 단리된 태반 세포 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포, 또는 태반 세포가 아닌 세포를 포함할 수 있다.
- [0243] 본원에 기재된 태반 유래 부착 세포를 포함하는 단리된 세포 집단은 제2 세포 유형, 예를 들어 태반 유래 부착 세포가 아닌 태반 세포, 또는 예를 들어 태반 세포가 아닌 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 태반 유래 부착 세포의 단리된 집단은 제2 유형의 세포의 집단을 포함할 수 있고, 예를 들어 그와 조합될 수 있고, 여기서 상기 제2 유형의 세포는, 예를 들어 배아 줄기 세포, 혈액 세포 (예를 들어, 태반 혈액, 태반 혈액 세포, 제대 혈액, 제대 혈액 세포, 말초 혈액, 말초 혈액 세포; 태반 혈액, 제대 혈액 또는 말초 혈액으로부터의 유핵 세포 등), 혈액으로부터 단리된 줄기 세포 (예를 들어, 태반 혈액, 제대 혈액 또는 말초 혈액으로부터 단리된 줄기 세포), 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포; 탯줄 줄기 세포, 혈액-유래 유핵 세포, 골수-유래 중간엽 기질 세포, 골수-유래 중간엽 줄기 세포, 골수-유래 조혈 줄기 세포, 조골 골수, 성체 (체세포) 줄기 세포의 집단, 조직, 배양된 세포, 예를 들어 배양된 줄기 세포 내에 함유된 줄기 세포의 집단, 완전 분화된 세포 (예를 들어, 연골세포, 섬유모세포, 양막 세포, 골모세포, 근육 세포, 심장 세포 등)의 집단, 혈관주위세포 등이다. 구체적인 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포를 포함하는 세포의 집단은 태반 줄기 세포 또는 탯줄로부터의 줄기 세포를 포함한다. 제2 유형의 세포가 혈액 또는 혈액 세포인 특정 실시양태에서, 적혈구는 세포 집단으로부터 제거되었다.
- [0244] 구체적인 실시양태에서, 제2 유형의 세포는 조혈 줄기 세포이다. 이러한 조혈 줄기 세포는 예를 들어, 비가공된 태반, 제대 혈액 또는 말초 혈액 내에; 태반 혈액, 제대 혈액 또는 말초 혈액으로부터의 총 유핵 세포 내에; 태반 혈액, 제대 혈액 또는 말초 혈액으로부터의 $CD34^+$ 세포의 단리된 집단 내에; 비가공된 골수 내에; 골수로부터의 총 유핵 세포 내에; 골수로부터의 $CD34^+$ 세포의 단리된 집단 내에 등에 함유될 수 있다.
- [0245] 또 다른 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포의 단리된 집단은 혈관계로부터의 많은 성체 또는 전구 세포와 조합된다. 다양한 실시양태에서, 세포는 내피 세포, 내피 전구 세포, 근세포, 심근세포, 혈관주위세포, 혈관모세포, 근모세포 또는 심근모세포이다.
- [0246] 또 다른 실시양태에서, 제2 세포 유형은 배아 줄기 세포와 연관된 만능성 및 기능의 마커를 발현하도록 배양물 내에서 조작되는 비-배아 세포 유형이다.
- [0247] 태반 유래 부착 세포의 상기 단리된 집단의 구체적인 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포 및 제2 유형의 세포 중 하나 또는 둘 모두는 세포의 의도된 수용자에 대해 자가유래 또는 동종이형의 것이다.
- [0248] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조성물은 태반 유래 부착 세포 및 배아 줄기 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조성물은 태반 유래 부착 세포 및 중간엽 기질 또는 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 기질 또는 줄기 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조성물은 골수-유래 조혈 줄기 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조성물은 태반 유래 부착 세포 및 조혈 전구 세포, 예를 들어, 골수, 태아 혈액, 제대 혈액, 태반 혈액, 및/또는 말초 혈액으로부터의 조혈 전구 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조성물은 태반 유래 부착 세포 및 체성 줄기 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 체성 줄기 세포는 신경 줄기 세포, 간 줄기 세포, 체장 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 심장 줄기 세포, 또는 근육 줄기 세포이다.
- [0249] 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 유형의 세포는 상기 집단 내의 세포의 약, 적어도, 또는 최대 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%를 구성한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물 내의 PDAC는 상기 조성물 내의 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%를 구성한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포는 상기 집단 내의 세포의 약, 적어도, 또는 최대 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45%를 구성한다.
- [0250] 태반 유래 부착 세포의 단리된 집단 내의 세포는 또 다른 유형의 많은 세포, 예를 들어 줄기 세포의 집단과, 각각의 집단 내의 총 유핵 세포의 수를 비교하여 약 100,000,000:1, 50,000,000:1, 20,000,000:1, 10,000,000:1, 5,000,000:1, 2,000,000:1, 1,000,000:1, 500,000:1, 200,000:1, 100,000:1, 50,000:1, 20,000:1, 10,000:1, 5,000:1, 2,000:1, 1,000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1,000; 1:2,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:50,000; 1:100,000; 1:500,000; 1:1,000,000; 1:2,000,000; 1:5,000,000; 1:10,000,000; 1:20,000,000; 1:50,000,000; 또는 약 1:100,000,000의 비로 조합될 수 있다. 태반 유래 부착 세포의 단리된 집단 내의 세포는 많은 세포 유형의 많은 세포와 또한

조합될 수 있다.

[0251] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 태반 세포, 예를 들어 상기 기재된 PDAC의 집단은 골형성 태반 부착 세포(OPAC), 예를 들어 2009년 8월 24일자로 출원된 발명의 명칭 "Methods and Compositions for Treatment of Bone Defects With Placental Stem Cells"의 특허 출원 번호 12/546,556에 기재된 OPAC와 조합되거나, 또는 양막-유리 혈관신생 세포(AMDAC), 예를 들어 발명의 명칭 "양막 유래 혈관형성 세포"의 미국 특허 출원 번호 12/622,352에 기재된 AMDAC와 조합되며, 상기 특허의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0252] 5.5 태반 세포 은행의 생산

[0253] 산후 태반으로부터의 분리된 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2.2에 기재된 분리된 태반 세포를 다수의 상이한 방식으로 배양하여, 분리된 태반 세포의 로트(lot) 세트를 생산할 수 있고, 예를 들어 여기서 로트는 개별적으로 투여가능한 용량들의 세트이다. 이러한 로트는, 예를 들어 태반 관류액으로부터 또는 효소로 소화 태반 조직으로부터의 세포로부터 획득할 수 있다. 다수의 태반으로부터 획득된, 태반 세포의 로트 세트가, 예를 들어 장기 보관을 위해 분리된 태반 세포들의 은행에 배열될 수 있다. 일반적으로, 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포가 태반 물질의 초기 배양물로부터 획득되어 종자 배양물을 형성하고, 이는 제어된 조건 하에 확장되어 대략 동등한 배가수의 세포의 집단을 형성한다. 로트는 바람직하게는 단일 태반의 조직으로부터 유래되지만, 다수의 태반의 조직으로부터 유래될 수 있다.

[0254] 한 실시양태에서, 태반 세포 로트가 하기와 같이 획득된다. 먼저 태반 조직을, 예를 들어 다져서 파괴하고, 적절한 효소, 예를 들어 트립신 또는 콜라게나제로 소화시킨다(상기 섹션 5.3.3 참조). 바람직하게는 태반 조직은, 예를 들어 단일 태반으로부터의 전체 양막, 전체 용모막, 또는 양쪽 모두를 포함하지만, 양막 또는 용모막의 일부분만을 포함할 수 있다. 소화된 조직을, 예를 들어 약 1 내지 3주, 바람직하게는 약 2주 동안 배양한다. 비-부착 세포를 제거한 후, 형성된 고밀도 콜로니를 예를 들어 트립신처리에 의해 수집하였다. 이러한 세포들을 수집하고, 편리한 부피의 배양 배지에 재현탁시킨 후, 확장 배양물에 시딩하는 데 사용한다. 확장 배양물은 개별적인 세포 배양 장치들, 예를 들어 셀 팩토리(Cell Factory)사의 NUNC™의 임의의 배열일 수 있다. 세포들은 확장 배양물에 예를 들어 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 또는 10×10^4 개 세포/cm²가 시딩되도록 임의의 정도로 세분될 수 있다. 바람직하게는, 약 1×10^3 내지 약 1×10^4 개 세포/cm²가 각각의 확장 배양물에 시딩하는 데 사용된다. 확장 배양물의 수는 세포가 획득되는 특정 태반(들)에 따라 수가 더 크거나 작을 수 있다.

[0255] 배양물 내의 세포의 밀도가 특정 값, 예를 들어 약 1×10^5 개 세포/cm²에 도달할 때까지 확장 배양물을 성장시킨다. 세포는 이 지점에서 수집 및 동결보존될 수 있거나, 또는 상기 기재된 바와 같이 새로운 확장 배양물로 계대배양될 수 있다. 세포는 사용 전에, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20회 계대배양될 수 있다. 바람직하게는 집단 배가의 누적 횟수의 기록이 확장 배양(들) 동안 유지된다. 배양물로부터의 세포는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 또는 40 배가, 또는 60 배가까지 확장될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 세포의 집단을 개별적인 용량으로 나누기 전의 집단 배가 횟수는 약 15 내지 약 30이다. 세포는 확장 프로세스 전반에 걸쳐 연속적으로 배양될 수 있거나, 또는 확장 동안 1회 이상의 지점에서 냉동될 수 있다.

[0256] 개별적인 용량에 사용될 세포는 추후의 사용을 위해 동결, 예를 들어 동결보존될 수 있다. 개별적인 용량은, 예를 들어 약 1백만 내지 약 5천만 개 세포/ml를 포함할 수 있고, 전체적으로는 약 10^6 개 내지 약 10^{10} 개 세포를 포함할 수 있다.

[0257] 따라서, 한 실시양태에서, 다수의 제1 집단 배가를 위해 인간 산후 태반으로부터 일차 배양 태반 세포를 확장시키는 단계; 상기 태반 세포를 동결보존하여, 마스터 세포 은행(Master Cell Bank)을 형성시키는 단계; 다수의 제2 집단 배가를 위해 마스터 세포 은행으로부터 다수의 태반 세포를 확장시키는 단계; 상기 태반 세포를 동결보존하여, 작업용 세포 은행(Working Cell Bank)을 형성시키는 단계; 다수의 제3 집단 배가를 위해 작업용 세포 은행으로부터 다수의 태반 줄기 세포를 확장시키는 단계; 및 상기 태반 세포를 개별적인 용량으로 동결보존하는 단계를 포함하고, 이때 상기 개별적인 용량들이 총괄적으로 태반 세포 은행을 구성하는 방법에 의해 태반 세포 은행이 제조될 수 있다. 임의적으로, 상기 다수의 제3 집단 배가로부터 다수의 태반 세포가 다수의 제4 집단 배가를 위해 확장될 수 있고, 개별적인 용량으로 동결보존될 수 있으며, 이때 상기 개별적인 용량들이 총괄적으

로 태반 세포 은행을 구성한다.

[0258] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 일차 배양 태반 세포는 태반 관류액으로부터의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 일차 배양 태반 세포는 소화된 태반 조직으로부터의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 일차 배양 태반 세포는 태반 관류액 및 소화된 태반 조직으로부터의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포 일차 배양물 내의 상기 태반 세포 모두는 동일한 태반으로부터의 것이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 이러한 방법은 상기 작업용 세포 은행으로부터의 상기 다수의 태반 세포로부터 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺ 태반 세포를 선택하여 개별적인 용량을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁴개 내지 약 10⁵개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁵개 내지 약 10⁶개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁶개 내지 약 10⁷개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁷개 내지 약 10⁸개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁸개 내지 약 10⁹개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁹개 내지 약 10¹⁰개의 태반 세포를 포함한다.

[0259] 바람직한 실시양태에서, 태반이 획득되는 공여자 (예를 들어, 모체)를 적어도 하나의 병원체에 대해 시험한다. 모체가 시험된 병원체에 대해 양성인 경우에, 태반으로부터의 전체 로트를 폐기한다. 이러한 테스트는 태반 세포 로트 생산 동안의 임의의 시점에, 예를 들어 확장 배양 동안 수행될 수 있다. 존재가 시험되는 병원체로는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, 인간 면역결핍 바이러스 (I형 및 II형), 시토메갈로바이러스, 헤르페스바이러스 등이 포함될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0260] 5.6 태반 세포의 보존

[0261] 단리된 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.3.2에 기재된 단리된 태반 세포를 보존할 수 있고, 즉 장기 보관을 허용하는 조건, 또는 예를 들어 아포토시스 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 놓을 수 있다.

[0262] 관련된 미국 출원 공보 번호 2007/0190042 (그의 개시내용은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 예를 들어 아포토시스 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 조성물을 사용하여, 태반 세포를 보존할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 유용한 세포의 집단을 보존하는 방법은 상기 세포의 집단을 아포토시스 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 아포토시스 억제제는 아포토시스 억제제와 접촉되지 않은 세포 집단에 비해 세포 집단 내에서 아포토시스를 감소 또는 방지하기 위해 충분한 양으로 그에 충분한 시간 동안 존재한다. 구체적 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제는 카스파제 억제제이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제는 JNK 억제제이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 JNK 억제제는 상기 세포의 분화 또는 증식을 조정하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포 수집 조성물은 상기 아포토시스 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 개별 상으로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포 수집 조성물은 에멀전 내에 상기 아포토시스 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 추가로 유화제, 예를 들어 레시틴을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 세포 접촉 시간에 약 0℃ 내지 약 25℃이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 세포 접촉 시간에 약 2℃ 내지 10℃ 또는 약 2℃ 내지 약 5℃이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 세포 집단의 수송 동안 수행된다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 세포의 집단의 동결 및 해동 동안 수행된다.

[0263] 태반 세포의 집단은, 예를 들어 상기 세포의 집단을 아포토시스 억제제 및 기관-보존 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 아포토시스 억제제는 아포토시스 억제제와 접촉되지 않은 세포의 집단과 비교하여, 이러한 세포의 집단에서 아포토시스를 감소시키거나 방지하는데 충분한 양으로, 및 이에 충분한 시간 동안 존재하는 방법에 의해 보존될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 기관-보존 화합물은 UW 용액 (미국 특허 번호 4,798,824에 기재되어 있음; 비아스판(ViaSpan)으로도 또한 공지됨; 또한 문헌 [Southard et al., Transplantation 49(2):251-257 (1990)] 참조) 또는 미국 특허 번호 5,552,267 (Stern et al.)에 기재되어 있는 용액이며, 이들 개시내용은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 기관-보존 화합물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, 또는 이들의 조합물이다. 또 다른 실시양태에서, 세포

수집 조성물은 추가로 산소-운반 퍼플루오로카본을 2-상으로 또는 에멀전으로서 포함한다.

[0264] 이러한 방법의 또 다른 실시양태에서, 태반 세포는 관류 동안 아포토시스 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본, 기관-보존 화합물 또는 이들의 조합물을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 조직 파괴 프로세스, 예를 들어 효소에 의한 소화 동안 상기 세포가 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포가 관류에 의한 수집 후에, 또는 조직 파괴, 예를 들어 효소에 의한 소화에 의한 수집 후에 상기 세포 수집 화합물과 접촉된다.

[0265] 전형적으로, 태반 세포 수집, 강화 및 단리 동안, 저산소증 및 기계적 스트레스로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 이러한 방법의 또 다른 실시양태에서, 세포 또는 세포의 집단이 상기 보존 동안 6시간 미만으로 수집, 강화 또는 단리 동안의 저산소성 조건에 노출되고, 이때 저산소성 조건은 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소 농도이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 상기 보존 동안 2시간 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 1시간 미만 또는 30분 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출되거나, 수집, 농축 또는 단리 동안 저산소 조건에 노출되지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 수집, 강화 또는 단리 동안 전단 스트레스에 노출되지 않는다.

[0266] 태반 세포가 동결보존될 수 있고, 예를 들어 소형 용기, 예를 들어 앰플 내의 동결보존 배지에 동결보존될 수 있다. 적합한 동결보존 배지로는 예를 들어 성장 배지를 비롯한 배양 배지, 또는 세포 동결 배지, 예를 들어 시판하는 세포 동결 배지, 예를 들어 C2695, C2639 또는 C6039 (시그마)가 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 동결보존 배지는 바람직하게는 DMSO (디메틸설폭시드)를, 예를 들어 약 2% 내지 약 15% (v/v), 예를 들어 약 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 동결보존 배지는 추가의 작용제, 예를 들어 메틸셀룰로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 바람직하게는 태반 세포는 동결보존 동안 약 1°C/분으로 냉각된다. 바람직한 동결보존 온도는 약 -80°C 내지 약 -180°C, 바람직하게는 약 -125°C 내지 약 -140°C이다. 동결보존된 세포는 사용하기 위해 해동하기 전에 액체 질소로 옮겨질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 앰플이 약 -90°C에서 도달하면 이들은 액체 질소 저장 구역으로 이송된다. 동결보존은 속도 제어 동결기를 사용하여 또한 이루어질 수 있다. 동결보존된 세포는 약 25°C 내지 약 40°C의 온도, 바람직하게는 약 37°C의 온도에서 해동된다.

[0267] 5.7 단리된 태반 세포를 포함하는 조성물

[0268] 본원에, 예를 들어 섹션 5.4.2에 기재된 태반 세포는 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용하기 위한 임의의 생리학상 허용되는 또는 의료상 허용되는 화합물, 조성물 또는 장치와 조합될 수 있다. 본원에 제공된 치료 방법에 유용한 조성물은 본원에 기재된 태반 세포 (상기 섹션 5.4.2 참조) 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 제약상 허용되는 조성물, 예를 들어 제약상 허용되는 담체 내에 태반 세포를 포함하는 조성물이다. 하기 섹션 5.9.2를 참조한다.

[0269] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포를 포함하는 조성물이 추가적으로 매트릭스, 예를 들어 세포제거 매트릭스 또는 합성 매트릭스를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 3차원 스캐폴드이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 콜라겐, 젤라틴, 라미닌, 피브로넥틴, 헤파틴, 오르니틴, 또는 비트로넥틴을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 매트릭스는 양막 또는 양막-유래 생체재료이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 세포의 막 단백질을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 합성 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 생물활성 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 생물활성 화합물은 성장 인자, 시토카인, 항체, 또는 5,000 달톤 미만의 유기 분자이다.

[0270] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 치료 방법에서 유용한 조성물은 상기 태반 세포 중 임의의 것 또는 상기 태반 세포 집단 중 임의의 것에 의해 조건화된 배지를 포함한다.

[0271] 5.7.1 동결보존된 단리된 태반 세포

[0272] 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 유용한 단리된 태반 세포 집단은 추후 사용을 위해 보존, 예를 들어 동결보존될 수 있다. 세포, 예컨대 줄기 세포의 동결보존 방법은 당업계에 공지되어 있다. 단리된 태반 세포 집단은 개체에게 용이하게 투여가능한 형태로 제조될 수 있고, 예를 들어 단리된 태반 세포 집단이 의학적 사용에 적절한 용기 내에 함유된다. 이러한 용기는, 예를 들어 단리된 태반 세포 집단이 용이하게 분배될 수 있는 시린지, 멸균 플라스틱 백, 플라스크, 병 또는 기타 용기일 수 있다. 예를 들어, 용기는 혈액 백, 또는 수용자에게 액체를 정맥내 투여하는데 적합한 의학적으로 허용되는 기타 플라스틱 백일 수 있다. 특정 실시양태에서, 용기는

조합된 세포 집단의 동결보존을 가능하게 하는 것이다.

[0273] 동결보존된 단리된 태반 세포 집단은 단일 공여자 또는 다수의 공여자로부터 유래된 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다. 단리된 태반 세포 집단은 의도되는 수용자에 대해 HLA가 완전히 매칭되거나, 또는 HLA가 부분적으로 또는 완전히 미스매칭될 수 있다.

[0274] 따라서, 한 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 용기 내의 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포 집단을 포함하는 조성물의 형태로 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포가 동결보존된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 용기는 백, 플라스크, 또는 병이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 백은 멸균 플라스틱 백이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 백은 예를 들어, 정맥내 주입에 의한 상기 단리된 태반 세포 집단의 정맥내 투여에 적합하거나 허용하거나 용이하게 한다. 백은 투여 이전에 또는 동안에 단리된 태반 세포와 하나 이상의 다른 용액, 예를 들어 약물의 혼합을 허용하도록 서로 연결된 다중 루멘 또는 구획을 포함할 수 있다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물은 조합된 세포 집단의 동결보존을 용이하게 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포 집단은 생리학상 허용되는 수성 용액 내에 함유된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 생리학상 허용되는 수용액은 0.9% NaCl 용액이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포 집단은 상기 세포 집단의 수용자에 대해 HLA가 매칭되는 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조합된 세포 집단은 상기 세포 집단의 수용자에 대해 적어도 부분적으로 HLA가 미스매칭되는 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 다수의 공여자로부터 유래된다.

[0275] 특정 실시양태에서, 용기 내의 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 단리된 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 또한 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 태반 세포는 또한 $CD45^{-}$ 또는 $CD90^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 태반 세포는 또한 $CD45^{-}$ 또는 $CD90^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD13^{+}$, $CD29^{+}$, $CD33^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD45^{-}$, $CD54^{+}$, $CD62E^{-}$, $CD62L^{-}$, $CD62P^{-}$, $SH3^{+}$ ($CD73^{+}$), $SH4^{+}$ ($CD73^{+}$), $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $SH2^{+}$ ($CD105^{+}$), $CD106/VCAM^{+}$, $CD117^{-}$, $CD144/VE$ -카드헤린^양, $CD184/CXCR4^{-}$, $CD200^{+}$, $CD133^{-}$, $OCT-4^{+}$, $SSEA3^{-}$, $SSEA4^{-}$, $ABC-p^{+}$, KDR^{-} ($VEGFR2^{-}$), $HLA-A,B,C^{+}$, $HLA-DP,DQ,DR^{-}$, $HLA-G^{-}$ 또는 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^{+}$) 중 하나 이상, 또는 이들의 임의의 조합이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD13^{+}$, $CD29^{+}$, $CD33^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD45^{-}$, $CD54/ICAM^{+}$, $CD62E^{-}$, $CD62L^{-}$, $CD62P^{-}$, $SH3^{+}$ ($CD73^{+}$), $SH4^{+}$ ($CD73^{+}$), $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $CD90^{+}$, $SH2^{+}$ ($CD105^{+}$), $CD106/VCAM^{+}$, $CD117^{-}$, $CD144/VE$ -카드헤린^양, $CD184/CXCR4^{-}$, $CD200^{+}$, $CD133^{-}$, $OCT-4^{+}$, $SSEA3^{-}$, $SSEA4^{-}$, $ABC-p^{+}$, KDR^{-} ($VEGFR2^{-}$), $HLA-A,B,C^{+}$, $HLA-DP,DQ,DR^{-}$, $HLA-G^{-}$ 및 프로그램화된 사멸-1 리간드 ($PDL1^{+}$)이다.

[0276] 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 언급된 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 단리된 $CD200^{+}$, $HLA-G^{-}$ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 줄기 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 세포이고, 이때 상기 단리된 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 태반 세포의 집단과 함께 배양되는 경우 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $HLA-G^{-}$ 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 용기 내에 함유된 $OCT-4^{+}$ 태반 세포이고, 이때 상기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 태반 세포의 집단과 함께 배양되는 경우 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진한다.

[0277] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 언급된 단리된 태반 세포는 유동 세포측정법에 의해 검출될 때 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 인 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포 (예를 들어, PDAC)이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리

된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 신경 표현형을 갖는 세포, 골형성 표현형을 갖는 세포, 또는 연골형성 표현형을 갖는 세포로 분화하는 잠재력을 갖는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출될 때 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출될 때 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 태반 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출될 때 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출될 때 $CD90^{+}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$, $CD90^{+}$, $CD45^{-}$ 세포는 추가로 유동 세포측정법에 의해 검출될 때 $CD80^{-}$ 및 $CD86^{-}$ 이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 세포는 추가로 $CD29^{+}$, $CD38^{-}$, $CD44^{+}$, $CD54^{+}$, $CD80^{-}$, $CD86^{-}$, $SH3^{+}$ 또는 $SH4^{+}$ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD44^{+}$ 이다. 상기 임의의 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포의 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD117^{-}$, $CD133^{-}$, KDR^{-} (VEGFR2 $^{-}$), $HLA-A,B,C^{+}$, $HLA-DP,DQ,DR^{-}$ 및/또는 $PDL1^{+}$ 중 하나 이상이다.

[0278] 상기 동결보존된 단리된 태반 세포들 중 임의의 것의 구체적 실시양태에서, 상기 용기는 백이다. 다양한 구체적 실시양태에서, 상기 용기는 대략, 최소 또는 최대 1×10^6 개의 상기 단리된 태반 세포, 5×10^6 개의 상기 단리된 태반 세포, 1×10^7 개의 상기 단리된 태반 세포, 5×10^7 개의 상기 단리된 태반 세포, 1×10^8 개의 상기 단리된 태반 세포, 5×10^8 개의 상기 단리된 태반 세포, 1×10^9 개의 상기 단리된 태반 세포, 5×10^9 개의 상기 단리된 태반 세포, 1×10^{10} 개의 상기 단리된 태반 세포, 또는 1×10^{10} 개의 상기 단리된 태반 세포를 포함한다. 상기 동결보존된 집단들 중 임의의 것의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 대략, 최소, 또는 최대 5회, 또는 최대 10회, 최대 15회, 또는 최대 20회 계대배양되었다. 상기 동결보존된 단리된 태반 세포들 중 임의의 것의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포가 상기 용기 내에서 확장되었다.

[0279] 구체적 실시양태에서, 태반 유래 부착 세포의 단일 단위 용량은 다양한 실시양태에서 약, 적어도, 또는 최대 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 그 초과인 태반 유래 부착 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 조성물은 50% 또는 그 초과인 생존가능한 세포를 포함하는 (즉, 집단 내의 적어도 50%의 세포가 기능적이거나 생존함) 태반 유래 부착 세포의 집단을 포함한다. 바람직하게는, 집단 중의 세포의 60% 이상이 생존성이다. 보다 바람직하게는, 제약 조성물에서 집단 중의 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%가 생존성이다.

[0280] 5.7.2 유전적으로 조작된 태반 세포

[0281] 또한, 태반 세포, 예를 들어 임의의 태반 다능 세포 또는 상기 섹션 5.2.2에 기재된 태반 세포, 또는 이러한 태반 세포를 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 상기 태반 세포는 혈관신생과 관련된, 또는 이를 촉진하는 제조합 또는 외인성 시토카인을 생산하도록 유전적으로 조작되어 있다. 특정 실시양태에서, 혈관신생을 촉진하는 상기 단백질은 간세포 성장 인자 (HGF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) (예를 들어, VEGFD), 섬유모세포 성장 인자 (FGF) (예를 들어, FGF2), 안지오팀닌 (ANG), 표피 성장 인자 (EGF), 상피-호중구-활성화 단백질 78 (ENA-78), 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 성장-조절 종양유전자 단백질 (GRO), 인터류킨-6 (IL-6), IL-8, 랩틴, 단핵구 화학주성 단백질-1 (MCP-1), MCP-3, 혈소판-유래 성장 인자 서브유닛 B (PDGFB), 란테스, 형질전환 성장 인자 베타 1 (TGF- β 1), 트롬보포이에틴 (Tpo), 메탈로프로테이나제 1 (TIMP1), TIMP2의 조직 억제제, 및/또는 우로키나제 플라스미노겐 활성화제 수용체 (uPAR) 중 하나 이상이다.

[0282] 예를 들어 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 세포를 유전적으로 조작하는 방법, 또는 당업자에게 공지된 다른 방법이 사용될 수 있다. 이들은 핵산 분자를 세포 내에 수송하고 발현하는 발현 벡터를 포함한다. (문헌 [Geoddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)] 참조). 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵생물 또는 진핵생물 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주 세포의 형질전환 또는

형질감염에 적합한 방법은 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)], 및 다른 실험 교재에서 볼 수 있다.

[0283] 태반 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2에 기재된 PDAC는, 예를 들어 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터, 예컨대 레트로 바이러스 (렌티바이러스 포함), 원숭이 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스, 신드비스 바이러스, 및 소 유두종 바이러스의 사용을 포함하는 바이러스 전달; 화학적 전달, 예를 들어 인산칼슘 형질감염 및 DEAE 텍스트란 형질감염 방법; 예를 들어 DNA-로딩 막 세포, 예컨대 리포솜, 적혈구 고스트, 및 원형질체를 사용한 막 융합 전달; 또는 물리적 전달 기술, 예컨대 미세주사, 전기천공, 또는 네이키드 DNA 전달을 포함하는 방법에 의해 DNA 또는 RNA, 예를 들어 관심있는 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA를 세포 내로 도입함으로써 유전적으로 변형될 수 있다. 태반 세포는 외인성 DNA의 삽입에 의해, 또는 세포 게놈의 절편의 외인성 DNA로의 치환에 의해 유전적으로 변형될 수 있다. 외인성 DNA 서열(들)의 삽입은, 예를 들어 상동성 재조합에 의해 또는 숙주 세포 게놈 내로의 바이러스 통합에 의해, 또는 플라스미드 발현 벡터 및 핵 국제화 서열을 사용한 DNA의 세포 내로, 특히 그의 핵 내로의 통합에 의해 수행될 수 있다. DNA는 특정 화학물질/약물, 예를 들어 테트라시클린을 사용하여 관심있는 단백질의 발현의 양성 또는 음성 유도를 허용하는 하나 이상의 프로모터를 포함할 수 있고; 다른 실시양태에서, 프로모터는 구성적일 수 있다.

[0284] 인산칼슘 형질감염은, 예를 들어 관심있는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 플라스미드 DNA를 세포 내로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, DNA를 염화칼슘의 용액과 합한 다음, 포스페이트-완충 용액에 첨가한다. 침전물이 형성되면, 용액을 배양된 세포에 직접 첨가한다. DMSO 또는 글리세롤을 사용한 처리는 형질감염 효율을 개선하기 위해 사용될 수 있고, 안정한 형질감염체의 수준은 비스-히드록시 에틸아미노 에탄술포네이트 (BES)를 사용하여 개선될 수 있다. 인산칼슘 형질감염 시스템은 상업적으로 이용 가능하다 (예를 들어, 프로텍션(PROFECTION)®, 프로메가 코포레이션(Promega Corp., 위스콘신주 매디슨)). DEAE-텍스트란 형질감염도 또한 이용될 수 있다.

[0285] 단리된 태반 세포는 또한 미세주사에 의해 유전적으로 조작될 수 있다. 특정 실시양태에서, 유리 마이크로피펫은 DNA 또는 RNA를 주입하기 위해 광학 현미경 하에 세포의 핵 내로 안내된다.

[0286] 또한, 태반 세포는 전기천공을 이용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, DNA 또는 RNA는 배양된 세포의 현탁액에 첨가되고, DNA/RNA-세포 현탁액을 2개의 전극 사이에 놓고, 전기 펄스를 적용하여 세포의 외막을 일시적으로 투과가능하게 만들고, 이것은 막을 가로지른 세공의 발생에 의해 분명해진다.

[0287] 세포를 유전적으로 변형하기 위한 DNA 또는 RNA의 리포솜 전달은 임의로 디올레오일 포스파티딜에탄올아민 (DOPE) 또는 디올레오일 포스파티딜콜린 (DOPC), 예를 들어 리포펙틴(LIPOFECTIN)® (라이프 테크놀로지스, 인크.(Life Technologies, Inc.))을 포함하는 양이온성 리포솜을 사용하여 수행할 수 있다. 다른 상업적으로 이용 가능한 전달 시스템은 에펙텐(EFFECTENE)™ (퀴아젠(Qiagen)), 도탐(DOTAP) (로슈 몰레큘라 바이오케미칼스(Roche Molecular Biochemicals)), 퓨젠 6(FUGENE 6)™ (로슈 몰레큘라 바이오케미칼스), 및 트랜스펙탐(TRANSFECTAM)® (프로메가)을 포함한다.

[0288] 바이러스 벡터는 예를 들어 표적 유전자, 폴리뉴클레오티드, 안티센스 분자 또는 리보자임 서열의 세포 내로의 전달에 의해 태반 세포를 유전적으로 변형하기 위해 사용될 수 있다. 레트로바이러스 벡터가 신속하게 분열하는 세포의 형질도입에 효과적이지만, 또한 많은 레트로바이러스 벡터가 DNA를 비-분열 세포 내로 효과적으로 전달하기 위해 개발되었다. 레트로바이러스 벡터에 대한 패키징 세포주는 당업자에게 공지되어 있다. 특정 실시양태에서, 레트로바이러스 DNA 벡터는 다중 클로닝 부위 내로 클로닝된 표적 유전자 서열에 작동가능하게 연결된 SV40 프로모터의 5'에 제1 LTR이 위치하고, 이어서 3'에 제2 LTR이 위치하도록 2개의 레트로바이러스 LTR을 함유한다. 일단 형성된 후에, 레트로바이러스 DNA 벡터는 이전에 설명된 바와 같이 인산칼슘-매개 형질감염을 사용하여 패키징 세포주 내로 전달된다. 바이러스 생산 약 48시간 후에, 이제 표적 유전자 서열을 함유하는 바이러스 벡터를 수거하였다. 렌티바이러스 벡터, 재조합 포진 바이러스, 아데노바이러스 벡터, 또는 알파바이러스 벡터를 사용하여 세포를 형질감염시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0289] 표적 세포의 성공적인 형질감염 또는 형질도입은 당업자에게 공지된 기술로 유전자 마커를 사용하여 입증될 수 있다. 예를 들어, 에퀴레아 빅토리아(Aequorea victoria)의 녹색 형광 단백질은 유전적으로 변형된 조혈 세포를 확인하고 추적하기 위한 효과적인 마커로 밝혀졌다. 다른 선택 마커는 β -Gal 유전자, 말단절단된 신경 성장 인자 수용체, 또는 약물 선택 마커 (비제한적으로 NEO, MTX, 또는 히드로마이신 포함)를 포함한다.

[0290] 5.7.3 제약 조성물

- [0291] 단리된 태반 세포, 예를 들어 PDAC의 집단, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이 생체 내에서, 예를 들어 본원에 제공된 치료 방법에서 사용하기 위한 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 이러한 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체, 예를 들어 염수 용액 또는 생체내 투여를 위한 또 다른 허용되는 생리학상 허용되는 용액 내에 단리된 태반 세포의 집단, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단을 포함한다. 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 포함하는 제약 조성물은 본원의 다른 곳에 기재된 단리된 태반 세포 집단 또는 단리된 태반 세포 중 임의의 것 또는 임의의 조합을 포함할 수 있다. 제약 조성물은 태아의 단리된 태반 세포, 모체의 단리된 태반 세포, 또는 태아 및 모체 양쪽 모두의 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 제약 조성물은 단일 개체 또는 태반으로부터 또는 다수의 개체 또는 태반으로부터 수득된 단리된 태반 세포를 추가로 포함할 수 있다.
- [0292] 본원에 제공된 제약 조성물은 임의의 개수의 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 예를 들어 단리된 태반 세포의 단일 단위 용량은 대략, 최소 또는 최대 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 또는 이를 초과하는 개수의 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다.
- [0293] 본원에 제공된 제약 조성물은 50% 생존 세포 또는 그 초과를 포함하는 세포의 집단을 포함한다 (즉, 집단 중 50% 이상의 세포가 기능하거나 살아있음). 바람직하게는, 집단 중의 세포의 60% 이상이 생존성이다. 더욱 바람직하게는, 제약 조성물에서 집단 중의 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%가 생존성이다.
- [0294] 본원에 제공된 제약 조성물은 예를 들어 생착을 용이하게 하는 하나 이상의 화합물 (예를 들어, 항-T-세포 수용체 항체, 면역억제제 등); 안정화제, 예컨대 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 히드록시에틸 전분, 플라즈마라이트 등을 포함할 수 있다.
- [0295] 주사용 용액으로 제제화되는 경우에, 한 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1% 내지 1.5% HSA 및 약 2.5% 텍스트란을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 제약 조성물은 5% HSA 및 10% 텍스트란을 포함하고 면역억제제, 예를 들어 시클로스포린 A (예를 들어, 10 mg/kg)를 임의로 포함하는 용액 내에 약 5×10^6 개 세포/밀리리터 내지 약 2×10^7 개 세포/밀리리터를 포함한다.
- [0296] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물, 예를 들어 용액은 다수의 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포를 포함하고, 이때 상기 제약 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/밀리리터 내지 약 3.75×10^6 개 세포/밀리리터를 포함한다. 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1×10^6 개 세포/mL 내지 약 50×10^6 개 세포/mL, 약 1×10^6 개 세포/mL 내지 약 40×10^6 개 세포/mL, 약 1×10^6 개 세포/mL 내지 약 30×10^6 개 세포/mL, 약 1×10^6 개 세포/mL 내지 약 20×10^6 개 세포/mL, 약 1×10^6 개 세포/mL 내지 약 15×10^6 개 세포/mL, 또는 약 1×10^6 개 세포/mL 내지 약 10×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 가시적인 세포 덩어리를 포함하지 않거나 (즉, 대형 세포 덩어리가 없음), 또는 이러한 가시적인 덩어리가 실질적으로 없다. 본원에 사용된 "대형 세포 덩어리"는 확대 없이 가시적인, 예를 들어 육안으로 가시적인 세포의 응집체를 의미하고, 일반적으로 약 150 마이크로미터보다 큰 세포 응집체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 약 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 또는 10% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란-40을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란-40을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 5.5% 텍스트란-40을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1% 내지 약 15% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% HSA를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 동결보존 및 해동되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 70 μ m 내지 100 μ m 필터를 통해 여과하였다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 가시성 세포 덩어리를 포함하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 200개 미만의 세포 덩어리를 포함하며, 여기서 상기 세포 덩어리는 현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 가시적이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 150개 미만의 세포 덩어리를 포함하며, 여기서 상기 세포 덩어리는 현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 가시적이다. 또 다른 구체적 실시

양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 100개 미만의 세포 덩어리를 포함하며, 여기서 상기 세포 덩어리는 현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 가시적이다.

[0297] 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터, 약 5.5% 텍스트란-40 (w/v), 약 10% HSA (w/v), 및 약 5% DMSO (v/v)를 포함한다.

[0298] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 다수의 세포, 예를 들어 다수의 단리된 태반 세포를 10% 텍스트란-40을 포함하는 용액 내에 함유하고, 이때 제약 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터를 포함하고, 상기 조성물은 육안으로 가시적인 세포 덩어리를 포함하지 않는다 (즉, 대형 세포 덩어리를 포함하지 않는다). 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/밀리리터 내지 약 3.75×10^6 개 세포/밀리리터를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 동결보존 및 해동되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 70 μ m 내지 100 μ m 필터를 통해 여과하였다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포 당 약 200개 미만의 미세 세포 덩어리 (즉, 확대했을 때만 가시적인 세포 덩어리)를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 10^6 개 세포 당 약 150개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 10^6 개 세포 당 약 100개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% 또는 2% 미만의 DMSO, 또는 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 또는 0.1% 미만의 DMSO를 포함한다.

[0299] 본원에 개시된 방법 중 하나에 의해 생성되는, 세포를 포함하는 조성물이 본원에 추가로 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 제약 조성물이 세포를 포함하고, 이때 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포를 포함하는 용액을 여과하여, 여과된 세포-함유 용액을 형성시키는 단계; 여과된 세포-함유 용액을, 예를 들어 동결보존 전에, 밀리리터 당 약 1 내지 50×10^6 개, 1 내지 40×10^6 개, 1 내지 30×10^6 개, 1 내지 20×10^6 개, 1 내지 15×10^6 개, 또는 1 내지 10×10^6 개 세포로 제1 용액으로 희석하는 단계; 및 생성된 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하지만 인간 혈청 알부민 (HSA)은 포함하지 않는 제2 용액으로 희석하여, 상기 조성물을 생산하는 단계에 의해 제약 조성물이 생산된다. 특정 실시양태에서, 약 15×10^6 개 세포/밀리리터 이하로 희석하였다. 특정 실시양태에서, 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 이하로 희석하였다. 특정 실시양태에서, 약 7.5×10^6 개 세포/밀리리터 이하로 희석하였다. 또 다른 특정 실시양태에서, 여과된 세포-함유 용액이 희석 전에 약 15×10^6 개 미만의 세포/밀리리터를 포함하는 경우에, 여과가 임의적이다. 다른 특정 실시양태에서, 희석 전의 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 미만을 포함하는 경우에, 여과는 임의적이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 여과된 세포-함유 용액이 희석 전에 약 7.5×10^6 개 미만의 세포/밀리리터를 포함하는 경우에, 여과는 임의적이다.

[0300] 구체적 실시양태에서, 세포는 제1 희석 용액에 의한 상기 희석 및 상기 제2 희석 용액에 의한 상기 희석 사이에 동결보존된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제1 희석 용액은 텍스트란 및 HSA를 포함한다. 제1 희석 용액 또는 제2 희석 용액 내의 텍스트란은 임의의 분자량의 텍스트란, 예를 들어 분자량이 약 10 kDa 내지 약 150 kDa인 텍스트란일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 또는 상기 제2 용액 내의 상기 텍스트란은 약 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 또는 10% 텍스트란이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 또는 상기 제2 희석 용액 내의 텍스트란은 텍스트란-40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 및 상기 제2 희석 용액 내의 텍스트란은 텍스트란-40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 내의 상기 텍스트란-40은 5.0% 텍스트란-40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 내의 상기 텍스트란-40은 5.5% 텍스트란-40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제2 희석 용액 내의 상기 텍스트란-40은 10% 텍스트란-40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 내의 상기 HSA는 1 내지 15% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 내의 상기 HSA는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 HSA를 포함한다. 또 다른 구체적

실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 내의 상기 HSA는 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 동결보호제를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 동결보호제는 DMSO이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제2 회석 용액 내의 상기 텍스트란-40은 약 10% 텍스트란-40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 조성물은 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/밀리리터 내지 약 3.75×10^6 개 세포/밀리리터를 포함한다.

[0301] 또 다른 실시양태에서, (a) 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포를 포함하는 세포-함유 용액을 동결보존 전에 여과하여, 여과된 세포-함유 용액을 생산하는 단계; (b) 여과된 세포-함유 용액 내의 세포를 약 1 내지 50×10^6 개, 1 내지 40×10^6 개, 1 내지 30×10^6 개, 1 내지 20×10^6 개, 1 내지 15×10^6 개, 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/밀리리터로 동결보존하는 단계; (c) 세포를 해동시키는 단계; 및 (d) 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란-40 용액으로 약 1:1 내지 약 1:11 (v/v) 희석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제약 조성물이 제조된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 전에 세포수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 미만이면, 여과가 임의적이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단계 (b)의 세포는 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL로 동결보존된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단계 (b)의 세포는 약 5% 내지 약 10% 텍스트란-40 및 HSA를 포함하는 용액 내에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 단계 (b)에서 약 15×10^6 개 세포/밀리리터 이하로 희석하였다.

[0302] 또 다른 실시양태에서, (a) 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포를 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란-40 용액에 현탁하여, 세포-함유 용액을 형성시키는 단계; (b) 세포-함유 용액을 70 μ m 필터로 여과하는 단계; (c) 세포-함유 용액을 5.5% 텍스트란-40, 10% HSA 및 5% DMSO를 포함하는 용액으로 약 1 내지 50×10^6 개, 1 내지 40×10^6 개, 1 내지 30×10^6 개, 1 내지 20×10^6 개, 1 내지 15×10^6 개, 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/밀리리터로 희석하는 단계; (d) 세포를 동결보존하는 단계; (e) 세포를 해동시키는 단계; 및 (f) 세포-함유 용액을 10% 텍스트란-40으로 1:1 내지 1:11 (v/v) 희석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제약 조성물이 제조된다. 특정 실시양태에서, 상기 단계 (c)에서의 희석은 약 15×10^6 개 세포/밀리리터 이하이다. 특정 실시양태에서, 상기 단계 (c)에서의 희석은 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하이다. 특정 실시양태에서, 상기 단계 (c)에서의 희석은 약 7.5×10^6 개 세포/mL 이하이다.

[0303] 또 다른 실시양태에서, 세포를 포함하는 조성물이 (a) 다수의 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (b) 세포를 5.5% 텍스트란-40에 재현탁하는 단계; (c) 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (d) 세포를 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란-40 용액에 재현탁시키는 단계; (e) 세포를 70 μ m 필터로 여과하는 단계; (f) 세포를 5.5% 텍스트란-40, 10% HSA 및 5% DMSO에서 약 1 내지 50×10^6 개, 1 내지 40×10^6 개, 1 내지 30×10^6 개, 1 내지 20×10^6 개, 1 내지 15×10^6 개, 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/밀리리터로 희석하는 단계; (g) 세포를 동결보존하는 단계; (h) 세포를 해동시키는 단계; 및 (i) 세포를 10% 텍스트란-40으로 1:1 내지 1:11 (v/v) 희석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 15×10^6 개 세포/밀리리터 이하로 희석하였다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석하였다. 특정 실시양태에서, 상기 단계 (f)에서의 희석은 약 7.5×10^6 개 세포/mL 이하이다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/밀리리터 미만인 경우에, 여과는 임의적이다.

[0304] 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물은 임의의 본원에 기재된 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다.

[0305] 세포성 제품의 투여에 적절한 또 다른 주사가 가능한 제제가 사용될 수 있다.

[0306] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 실질적으로 또는 완전히 비-모체 기원인, 즉 태아 유전자형을 갖는 단리된 태반 세포를 포함하며, 예를 들어 적어도 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 약 100%가 비-모체 기원이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 제약 조성물은 CD200⁺ 및 HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺; CD200⁺ 및 OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺

및 HLA-G⁻; CD73⁺ 및 CD105⁺이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포의 집단을 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 단리된 태반 세포의 집단; 또는 OCT-4⁺이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포의 집단을 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 단리된 태반 세포의 집단; 또는 이들의 조합인 단리된 태반 세포의 집단을 포함하며, 여기서 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 CD10⁺, CD105⁺ 및 CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 및 CD34⁻; CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻이고, CD90⁺ 또는 CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ 및 CD45⁻; CD10⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ 및 CD45⁻; CD200⁺ 및 HLA-G⁻; CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺; CD200⁺ 및 OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁻; CD73⁺ 및 CD105⁺ 중 하나 이상이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 단리된 태반 세포의 집단; OCT-4⁺이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하는 단리된 태반 세포의 집단; 또는 CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ 및/또는 PDL1⁺ 중 하나 이상인 단리된 태반 세포의 집단; 또는 이들의 조합인 단리된 태반 세포의 집단을 포함하며, 여기서 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 구체적인 실시양태에서, 제약 조성물은 태반으로부터 획득되지 않은 줄기 세포를 추가로 포함한다.

[0307] 본원에 제공된 조성물, 예를 들어 제약 조성물 중의 단리된 태반 세포는 단일 공여자로부터 또는 다중 공여자로부터 유래된 태반 세포를 포함할 수 있다. 단리된 태반 세포는 의도된 수용자에게 완전히 HLA-매칭되거나, 또는 부분적으로 또는 완전히 HLA-미스매칭될 수 있다.

[0308] 5.7.4 단리된 태반 세포를 포함하는 매트릭스

[0309] 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단을 포함하는 매트릭스, 히드로겔, 스캐폴드 등을 포함하는 조성물이 본원에 추가로 제공된다. 이러한 조성물은 액체 현탁액 내의 세포 대신에 또는 그에 추가로 사용될 수 있다.

[0310] 본원에 기재된 단리된 태반 세포가 천연 매트릭스, 예를 들어 태반 생체재료 예컨대 양막 물질 상에 시딩될 수 있다. 이러한 양막 물질은, 예를 들어 포유동물 태반으로부터 직접적으로 해부된 양막; 고정되거나 열 처리된 양막, 실질적으로 무수인 (즉 H₂O 20% 미만인) 양막, 용모막, 실질적으로 무수인 용모막, 실질적으로 무수인 양막 및 용모막 등일 수 있다. 단리된 태반 세포가 시딩될 수 있는 바람직한 태반 생체재료가 미국 출원 공보 번호 2004/0048796 (Hariri)에 기재되어 있고, 그의 개시내용은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0311] 본원에 기재된 단리된 태반 세포가 예를 들어 주사에 적절한 히드로겔 용액에 현탁될 수 있다. 상기 조성물에 적합한 히드로겔은 자가조립형 펩티드, 예를 들어 RAD16을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포를 포함하는 히드로겔 용액은, 예를 들어 주형 내에서, 세포가 내부에 분산되어 있는 주입용 매트릭스를 형성하도록 경화될 수 있다. 이러한 매트릭스 내의 단리된 태반 세포는 이식 전에 세포가 유사분열에 의해 확장되도록 또한 배양될 수 있다. 히드로겔은, 예를 들어 물 분자를 포획하는 3차원 개방형 격자 구조를 생성하도록 공유 결합, 이온 결합 또는 수소 결합을 통해 가교되어 겔을 형성하는 유기 중합체 (천연 또는 합성)이다. 히드로겔-형성 물질로는 폴리스카라이드, 예컨대 알기네이트 및 그의 염, 펩티드, 폴리포스파진, 및 폴리아크릴레이트 (이온적으로 가교됨), 또는 블록 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 옥시드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 (온도 또는 pH에 의해 가교됨)가 각각 포함된다. 일부 실시양태에서, 히드로겔 또는 매트릭스는 생분해성이다.

[0312] 일부 실시양태에서, 제제는 계내 중합성 겔을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 출원 공보 번호 2002/0022676 (그의 개시내용은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함됨); 문헌 [Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3): 199-209 (2002)]; [Wang et al., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003)] 참조).

[0313] 일부 실시양태에서, 중합체는 수용액, 예컨대 물, 완충 염 용액, 또는 하전된 측기를 갖는 수성 알콜 용액, 또는 그의 1가 이온성 염에 적어도 부분적으로 가용성이다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측기를 갖는 중합체의 예는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 아크릴산과 메타크릴산의 공중합체, 폴리(비닐 아세테이트), 및 황산화 중합체, 예컨대 황산화 폴리스티렌이다. 아크릴산 또는 메타크릴산 및 비닐 에테르 단량체 또는 중합체의 반응에 의해 형성된 산성 측기를 갖는 공중합체가 또한 사용될 수 있다. 산성 기의 예는 카르복

실산 기, 술폰산 기, 할로젠화 (바람직하게는 플루오린화) 알콜 기, 페놀계 OH 기, 및 산성 OH 기이다.

- [0314] 구체적 실시양태에서, 매트릭스는 생체흡수성 물질, 예를 들어, PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 블렌드, 또는 히알루론산으로부터 제조된 멀티필라멘트사로 이루어질 수 있는 펠트이다. 상기 멀티필라멘트사는 크립핑, 커팅, 카딩 및 니들링으로 이루어지는 표준 직물 가공 기술을 이용하여 펠트로 제조된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 세포는 복합 구조물일 수 있는 발포체 스캐폴드 상에 집중될 수 있다. 추가로, 3차원 프레임워크는 유용한 형상, 예를 들어 복원, 대체 또는 확대시킬 신체 내의 특정 구조물로 성형될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 스캐폴드의 예는 부직포 매트, 다공성 발포체, 또는 자가조립형 펠티드를 포함한다. 부직포 매트 는 글리콜산 및 락트산의 합성 흡수성 공중합체 (예를 들어, PGA/PLA)로 구성된 섬유 (비크릴(VICRYL), 에티콘, 인크.(Ethicon, Inc.), 뉴저지주 숨머빌 소재)를 사용하여 형성할 수 있다. 동결-건조 또는 냉동건조와 같은 프로세스에 의해 형성된, 예를 들어 폴리(ϵ -카프로락톤)/폴리(글리콜산) (PCL/PGA) 공중합체로 구성된 발포체 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,355,699 참조)가 또한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.
- [0315] 본원에 기재된 단리된 태반 세포 또는 그의 공동-배양물이 3차원 프레임워크 또는 스캐폴드 상에 시딩되어 생체 내로 이식될 수 있다. 이러한 프레임워크는 조직 형성을 예를 들어 자극하는 임의의 1가지 이상의 성장 인자, 세포, 약물 또는 기타 성분과 조합되어 이식될 수 있다.
- [0316] 사용될 수 있는 스캐폴드의 예로는 부직포 매트, 다공성 발포체, 또는 자가 조립형 펠티드가 포함된다. 부직포 매트 는 글리콜산 및 락트산의 합성 흡수성 공중합체 (예를 들어, PGA/PLA)로 구성된 섬유 (비크릴, 에티콘, 인크., 뉴저지주 숨머빌)를 사용하여 형성할 수 있다. 동결-건조 또는 냉동건조와 같은 프로세스에 의해 형성된, 예를 들어 폴리(ϵ -카프로락톤)/폴리(글리콜산) (PCL/PGA) 공중합체로 구성된 발포체 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,355,699 참조)가 또한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.
- [0317] 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 생체흡수성 물질 예컨대 PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 블렌드, 또는 히알루론산으로부터 제조된 멀티필라멘트사로 예를 들어 구성될 수 있는 펠트 상에 시딩되거나 또는 이와 접촉될 수 있다.
- [0318] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 단리된 태반 세포가 복합 구조물일 수 있는 발포체 스캐폴드 상에 시딩될 수 있다. 이러한 발포체 스캐폴드는 유용한 형상, 예컨대 복원, 대체 또는 확대될 신체 내의 특정 구조물의 일 부분의 형상으로 성형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 부착을 향상시키기 위해, 프레임워크를 예를 들어, 0.1M 아세트산으로 처리한 후 폴리리신, PBS 및/또는 콜라겐 내에서 인큐베이팅한 후, 세포를 접촉한다. 매트릭스의 외부 표면은, 예컨대 매트릭스의 혈장-코팅, 또는 하나 이상의 단백질 (예를 들어, 콜라겐, 탄성 섬유, 세망 섬유), 당단백질, 글리코사미노글리칸 (예를 들어, 헤파린 황산염, 콘드로이틴-4-황산염, 콘드로이틴-6-황산염, 데르마탄 황산염, 케라틴 황산염 등), 세포 매트릭스, 및/또는 기타 물질, 예컨대 이들로 한정되는 것은 아닌 젤라틴, 알기네이트, 한천, 아가로스 및 식물 검 등의 첨가에 의해, 세포의 부착 또는 성장 및 조직의 분화를 개선시키기 위해 변형될 수 있다.
- [0319] 일부 실시양태에서, 스캐폴드는 이를 비-혈전형성성하도록 하는 물질을 포함하거나 또는 이러한 물질로 처리될 수 있다. 이러한 처리 및 물질은 내피 성장, 이동, 및 세포의 매트릭스 침착을 또한 촉진하고 유지시킬 수 있다. 이러한 재료 및 처리의 예는 천연 재료 예컨대 기저막 단백질 예컨대 라미닌 및 IV형 콜라겐, 합성 재료 예컨대 EPTFE, 및 분절형 폴리우레탄 실리콘, 예컨대 푸르스판(PURSPAN)TM (더 폴리머 테크놀로지 그룹, 인크.(The Polymer Technology Group, Inc.), 캘리포니아주 버클리)을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 스캐폴드는 항-혈전제 예컨대 헤파린을 또한 포함할 수 있고; 또한 스캐폴드는 단리된 태반 세포의 시딩 전에 표면 전하가 변경되도록 처리될 수 있다 (예를 들어, 혈장으로 코팅됨).
- [0320] 본원에 제공된 태반 세포 (예를 들어, PDAC)는 또한 모노-, 디-, 트리-, 알파-트리-, 베타-트리-, 및 테트라-칼슘 포스페이트, 히드록시아파타이트, 플루오로아파타이트, 황산칼슘, 플루오린화칼슘, 산화칼슘, 탄산칼슘, 마그네슘 칼슘 포스페이트, 생물학적 활성 유리, 예컨대 바이오글래스(BIOGLASS)[®], 및 이들의 혼합물을 포함하고 이로 제한되지 않는 생리학상 허용되는 세라믹 물질 상에 집중되거나 그와 접촉될 수 있다. 현재 시판되는 다공성 생체적합성 세라믹 물질은 서지본(SURGIBONE)[®] (캔메디카 코퍼레이션(CanMedica Corp.), 캐나다), 엔도본(ENDOBON)[®] (머크 바이오머티리얼 프랑스(Merck Biomaterial France), 프랑스), 세로스(CEROS)[®] (마티스, 아게(Mathys, AG), 스위스 베틀라히), 및 광물화된 콜라겐 골 이식 제품, 예컨대 힐로스(HEALOS)TM (데퓨이, 인크.(DePuy, Inc.), 매사추세츠주 레인햄) 및 비토스(VITOSS)[®], 라코스(RHAKOSS)TM, 및 코르토스(CORTOSS)[®] (오

르토비타(Orthovita), 펜실베니아주 앨번)를 포함한다. 프레임워크는 천연 및/또는 합성 물질의 혼합물, 블렌드 또는 복합물일 수 있다.

- [0321] 한 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 약 0.5×10^6 개 내지 약 8×10^6 개 세포/mL로 적절한 스캐폴드 상에 시딩되거나 이와 접촉된다.
- [0322] 5.8 불멸화 태반 세포주
- [0323] 성장-촉진 유전자, 즉, 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성이 외부 인자에 의해 조절가능하도록, 형질감염된 세포의 성장을 적합한 조건 하에 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 임의의 적절한 벡터로의 형질감염에 의해 포유동물 태반 세포, 예를 들어 PDAC가 조건부로 불멸화될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 성장-촉진 유전자는 종양유전자, 예컨대 비제한적으로 v-myc, N-myc, c-myc, p53, SV40 대형 T 항원, 폴리오마 대형 T 항원, E1a 아데노바이러스 또는 인간 유두종바이러스의 E7 단백질이다.
- [0324] 성장-촉진 단백질의 외부 조절은 성장-촉진 유전자를 외부-조절가능 프로모터, 예를 들어 형질감염된 세포의 온도 또는 세포와 접촉되는 배지의 조성을 변화시킴으로써 예를 들어 활성이 제어될 수 있는 프로모터의 제어 하에 놓음으로써 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 테트라시클린 (tet)-제어 유전자 발현 시스템이 사용될 수 있다 (문헌 [Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992]; [Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996] 참조). tet의 부재 하에, 상기 벡터 내의 tet-제어된 전사활성인자 (tTA)는 ph_{CMV}^{*1} (tet 오퍼레이터 서열에 융합된 인간 시토크로마 바이러스로부터의 최소 프로모터)로부터의 전사를 강하게 활성화시킨다. tTA는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)의 트랜스포존-10-유래 tet 내성 오페론의 리프레서 (tetR) 및 단순 헤르페스 바이러스의 VP16의 산성 도메인의 융합 단백질이다. tet의 낮은 비-독성 농도 (예를 들어, 0.01 내지 1.0 $\mu\text{g/mL}$)에서 tTA에 의한 전사활성화가 거의 완전히 폐지된다.
- [0325] 한 실시양태에서, 벡터는 선택가능 마커, 예를 들어 약물 내성을 부여하는 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 함유한다. 박테리아 네오마이신 내성 유전자 (neo^R)가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 이러한 마커 중의 하나이다. neo^R 을 보유하는 세포는 당업자에게 공지된 수단, 예를 들어 성장 배지에 예를 들어 100-200 $\mu\text{g/mL}$ G418의 첨가에 의해 선택할 수 있다.
- [0326] 형질감염은 레트로바이러스 감염이 포함되지만 이것으로 한정되는 것은 아닌, 당업자에게 공지된 다양한 수단들 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있다. 일반적으로, 세포 배양물은 벡터에 대한 생산자 세포주로부터 수집된 조건화 배지 및 N2 보충물 함유 DMEM/F12의 혼합물과의 인큐베이션에 의해 형질감염시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 제조된 태반 세포 배양물이 1 부피의 조건화 배지 및 2 부피의 N2 보충물 함유 DMEM/F12에서의 약 20시간 동안의 인큐베이션에 의해 시험관 내에서 예를 들어 5일 후에 감염될 수 있다. 그후, 선택가능 마커를 보유하는 형질감염된 세포가 상기 기재된 바와 같이 선택될 수 있다.
- [0327] 형질감염 후, 증식을 허용하는, 예를 들어 세포의 30% 이상이 24시간의 기간 내에 배가되도록 하는 표면 상에 배양물이 계대배양된다. 바람직하게는, 기질은 폴리오르니틴 (10 $\mu\text{g/mL}$) 및/또는 라미닌 (10 $\mu\text{g/mL}$)으로 코팅된 조직 배양 플라스틱, 폴리리신/라미닌 기질 또는 피브로넥틴으로 처리된 표면으로 구성된 폴리오르니틴/라미닌 기질이다. 그후, 하나 이상의 증식 증강 인자가 보충되었거나 보충되지 않았을 수 있는 성장 배지가 배양물에 3 내지 4일마다 공급된다. 배양물이 50% 미만의 전면배양률을 보이는 경우 증식 증강 인자가 성장 배지에 첨가될 수 있다.
- [0328] 80-95% 전면배양률이 되었을 때, 표준 기술을 사용하여, 예컨대 트립신처리에 의해 조건부로 불멸화된 태반 세포주가 계대배양될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대략 20회의 계대배양까지, 선택을 유지하는 것이 유리하다 (예를 들어, 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 세포에 대한 G418의 첨가에 의해). 또한 장기 보관을 위해 세포를 액체 질소 내에 동결시킬 수 있다.
- [0329] 상기 기재된 바와 같이 제조된 조건부로 불멸화된 인간 태반 세포주로부터 클론 세포주가 단리될 수 있다. 일반적으로, 이러한 클론 세포주를 표준 기술을 사용하여, 예컨대 제한 희석에 의해 또는 클로닝 고리를 사용하여 단리할 수 있고, 확장할 수 있다. 일반적으로, 상기 기재된 바와 같이 클론 세포주에 영양을 공급하고 계대배양시킬 수 있다.
- [0330] 클론성일 수 있지만 반드시 클론성일 필요는 없는, 조건부로 불멸화된 인간 태반 세포주는, 일반적으로, 분화를 촉진하는 배양 조건 하에 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성을 억제함으로써 분화되도록 유도될 수 있다.

예를 들어, 성장-촉진 단백질을 코딩하는 유전자가 외부적으로 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있는 경우에, 조건, 예를 들어 배지의 조성 또는 온도를 변형하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제할 수 있다. 상기 논의된 테트라시클린-제어 유전자 발현 시스템에 대해, 테트라시클린을 첨가하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제함으로써 분화가 달성될 수 있다. 일반적으로, 4-5일 동안의 1 $\mu\text{g/mL}$ 테트라시클린이 분화를 개시시키는 데 충분하다. 추가적인 분화를 촉진하기 위해, 추가적인 작용제가 성장 배지에 포함될 수 있다.

[0331] 5.9 키트

[0332] 또 다른 측면에서, 키트의 나머지 내용물로부터 분리된 용기 내에, 조직 배양 플라스틱 부착성 다능 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.2에 기재된 세포 (PDAC), 및 사용지침서를 포함하는, 순환계의 질환 또는 장애를 갖는 개체의 치료에 적합한 키트가 본원에 제공된다. 바람직하게는, 태반 세포는 제약상 허용되는 용액, 예를 들어 병변내 투여에 적합한 용액 또는 정맥내 투여에 적합한 용액 내에서 제공된다. 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포 또는 태반 다능 세포는 본원에 기재된 CD10^+ , CD34^- , CD105^+ 태반 세포, 예를 들어 CD10^+ , CD34^- , CD105^+ , CD200^+ 태반 세포 또는 CD10^+ , CD34^- , CD45^- , CD90^+ , CD105^+ , CD200^+ 태반 세포 중 임의의 것일 수 있다.

[0333] 특정 실시양태에서, 키트는 태반 세포를 개체에게 전달하는 것을 촉진하는 하나 이상의 성분을 포함한다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 키트는 개체에게 태반 세포를 병변내로 전달하는 것을 촉진하는 성분을 포함한다. 상기 실시양태에서, 키트는 예를 들어 세포의 개체에 대한 전달에 적합한 주사기 및 바늘 등을 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 태반 세포는 키트에서 백 내에 또는 하나 이상의 바이알 내에 함유될 수 있다. 또 다른 특정 실시양태에서, 키트는 개체에게 태반 세포를 정맥내 또는 동맥내 전달하는 것을 용이하게 하는 성분을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 태반 세포는, 예를 들어 병 또는 백 (예를 들어, 세포를 포함하는 용액을 약 1.5 L까지 함유할 수 있는 혈액 백 또는 유사한 백) 내에 함유될 수 있고, 키트는 개체에게 세포를 전달하는 데 적절한 튜빙 및 바늘을 추가적으로 포함한다.

[0334] 추가로, 키트는 개체에서 통증 또는 염증을 감소시키는 하나 이상의 화합물 (예를 들어, 진통제, 스테로이드성 또는 비-스테로이드성 항염증 화합물 등)을 포함할 수 있다. 키트는 항박테리아 또는 항바이러스 화합물 (예를 들어, 하나 이상의 항생제), 개체에서 불안을 감소시키는 화합물 (예를 들어, 알라프라졸람), 개체에서 면역 반응을 감소시키는 화합물 (예를 들어, 시클로스포린 A), 항히스타민제 (디펜히드라민, 로라타딘, 데스로라타딘, 쿠에티아핀, 펙소페나딘, 세티리진, 프로메타진, 클로르페니라민, 레보세티리진, 시메티딘, 파모티딘, 라니티딘, 니자티딘, 록사티딘, 라푸티딘 등)을 또한 포함할 수 있다.

[0335] 추가적으로, 키트는 1회용품, 예를 들어 멸균 와이프(wipe), 1회용 종이 상품, 장갑 등을 포함할 수 있고, 이들은 개체가 전달에 대비하는 것을 용이하게 하거나 또는 태반 세포 투여 결과로서의 개체에서의 감염 가능성을 감소시킨다.

[0336] 6. 실시예

[0337] 6.1 실시예 1: 태반 유래 부착 세포의 표현형 특성화

[0338] 본 실시예는 태반 세포 (CD10^+ , CD34^- , CD105^+ , CD200^+ 태반 줄기 세포, 또한 PDAC로 불림)에 의한 혈관신생 인자의 분비를 입증한다.

[0339] 6.1.1 태반 유래 부착 세포의 혈관신생 효능의 평가를 위한 분비단백질체 (secretome) 프로파일링

[0340] 멀티플렉스비드 검정: 계대배양 6의 태반 유래 부착 세포를 성장 배지 중에 동일 세포 수로 플레이팅하고, 조건화 배지를 48시간 후에 수집하였다. 세포-조건화 배지 내의 다수의 혈관신생 시토카인/성장 인자에 대한 동시 정성 분석을 자기 비드-기반 멀티플렉스 검정 (바이오-플렉스 프로TM, 바이오-라드(Bio-Rad), 캘리포니아주)을 이용하여 수행하였고, 검정으로 혈청, 혈장 및 세포/조직 배양 상청액을 포함하는 다양한 매트릭스에서 혈관신생 바이오마커를 측정하였다. 이러한 96-웰의 플레이트-포맷의 비드-기반 검정의 원리는 포획 샌드위치 면역검정과 유사하다. 목적 혈관신생 표적에 대해 지정된 항체를 내부 염색된 비드에 공유적으로 커플링시켰다. 커플링된 비드를 혈관신생 표적을 함유하는 샘플과 반응시켰다. 일련의 세척으로 비결합 단백질을 제거한 후, 다양한 에피토프에 대해 특이적인 비오틴화 검출 항체를 반응물에 첨가하였다. 결과로서, 혈관신생 표적의 주위에 항체의 샌드위치가 형성되었다. 이어서, 스트렙타비딘-PE를 첨가하여, 비드 표면의 비오틴화 검출 항체에 결합시켰다. 간략하게, 멀티플렉스 검정은 제조업체의 지침에 따라 수행하였고, 조건화 배지 중 각각의 혈

관신생 성장 인자의 양을 평가하였다.

[0341] ELISA: 세포-조건화 배지 중 단일 혈관신생 시토카인/성장 인자의 정량 분석을 알앤디 시스템즈 (미네소타주 미네아폴리스)로부터 상업적으로 입수가능한 키트를 이용하여 수행하였다. 간략하게, ELISA 검정은 제조업체의 지침에 따라 수행하였고, 조건화 배지 중 각각의 혈관신생 성장 인자의 양을 평가하였다.

[0342] PDAC에 의한 다양한 혈관신생 단백질의 분비 수준을 도 1에 나타내었다.

표 1

혈관신생 마커에 대한 멀티플렉스 및 ELISA 결과

PDAC 마커	양성	음성	분비단백질체 분석 ELISA, 멀티플렉스
ANG	X		X
EGF	X		X
ENA-78	X		X
FGF2	X		X
폴리스타틴	X		X
G-CSF	X		X
GRO	X		X
HGF	X		X
IL-6	X		X
IL-8	X		X
렘틴	X		X
MCP-1	X		X
MCP-3	X		X
PDGFB	X		X
PLGF	X		X
란테스	X		X
TGFB1	X		X
트롬보포이에틴	X		X
TIMP1	X		X
TIMP2	X		X
uPAR	X		X
VEGF	X		X
VEGFD	X		X

[0343]

[0344] 별도의 실험에서, PDAC는 안지오프이에틴-1, 안지오프이에틴-2, PECAM-1 (CD31; 혈소판 내피 세포 부착 분자), 라미닌 및 피브로넥틴도 분비하는 것으로 확인되었다.

[0345] 6.2 실시예 2: 태반 세포의 기능적 특성화

[0346] 본 실시예는 혈관신생 및 분화 능력과 관련된 태반 세포 (CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기 세포, 또한 PDAC로 불림)의 다양한 특성을 입증한다.

[0347] 6.2.1 PDAC의 혈관신생 효능의 평가를 위한 HUVEC 관 형성

[0348] 인간 체대 정맥 내피 세포 (HUVEC)를 EGM-2 배지 (캄브렉스, 뉴저지주 이스트 루더포드)에서 3일 동안 계대배양 3 이하로 계대배양하고, 대략 70%-80%의 전면배양률에서 수확하였다. HUVEC를 기초 배지/항생제 (DMEM/F12 (킵코))로 1회 세척하고, 동일한 배지 내에 목적하는 농도로 재현탁시켰다. HUVEC는 제조 1시간 이내에 사용하였다. 인간 태반 콜라겐 (HPC)을 10 mM HCl (pH 2.25) 내에 1.5 mg/mL의 농도로 넣고, 완충제를 사용하여 pH 7.2로 "중화"하고, 사용시까지 병상에 유지시켰다. HPC를 4000개 세포/ μ l의 최종 세포 농도로 HUVEC 현탁액과 혼합하였다. 생성된 HUVEC/HPC 현탁액을 즉시 피펫을 사용하여 96-웰 플레이트에 3 μ l/웰로 분배하였다 (플레이트 주위는 증발을 방지하기 위해서 멸균 PBS로 미리 충전하여야 하고; 조건당 n = 5임). HUVEC 방울을 콜라겐

중합체화를 위해 배지를 첨가하지 않으면서 37℃ 및 5% CO₂에서 75-90분 동안 인큐베이션하였다. "건식" 인큐베이션의 완료시에, 각각의 웰을 200 μ l의 조건화 PDAC 배지 (n = 2 세포주) 또는 대조군 배지 (예를 들어, 음성 대조군으로서 DMEM/F12, 및 양성 대조군으로서 EGM-2)로 부드럽게 채우고, 37℃ 및 5% CO₂에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 계대배양 6에서 PDAC를 성장 배지 내에서 4 - 6시간 동안 인큐베이션함으로써 조건화 배지를 제조하고; 부착 및 도말 후에, 배지를 24시간 동안 DMEM/F12로 변경하였다. 인큐베이션 후에, HUVEC 방울을 파괴하지 않으면서 배지를 웰로부터 제거하고, 웰을 PBS로 1회 세척하였다. 이어서, HUVEC 방울을 10초 동안 고정하고, Diff-Quik 세포 염색 키트로 1분 동안 염색한 후, 멸균수로 3회 행구었다. 염색된 방울을 공기 건조하고, 각각의 웰의 영상을 자이스 스테레오 디스커버리(Zeiss SteReo Discovery) V8 현미경을 사용하여 얻었다. 이어서, 영상을 컴퓨터 소프트웨어 패키지 ImageJ 및/또는 MatLab을 이용하여 분석하였다. 영상을 컬러로부터 8-비트 그레이 스케일 영상으로 전환하고, 흑백 영상으로 전환하기 위해 문턱값에 적용하였다. 이어서, 영상을 입자 분석 특징을 사용하여 분석하고, 이를 통해 계수값 (개별 입자의 수), 총 면적, 평균 크기 (개별 입자의), 및 검정에서 내피 관 형성량에 동등시되는 면적 분율을 비롯하여 화소 밀도 데이터를 얻었다.

[0349] 조건화 배지는 관 형성의 유도에 의해 입증되는 바와 같이 내피 세포에 대한 혈관신생 효과를 행사하였다 (도 2 참조).

[0350] 6.2.2 HUVEC 이동 검정

[0351] 본 실험은 태반 유래 부착 세포의 혈관신생 능력을 입증하였다. HUVEC를 피브로넥틴 (FN)-코팅 12-웰 플레이트에서 단층 전면배양시까지 성장시키고, 웰을 가로질러 무세포성 라인을 생성하기 위해 단층에 1 mL 플라스틱 피펫 끝부분으로 "상처를 내었다". "상처낸" 세포를 성장 3일 후에 PDAC로부터 얻은 혈청-무함유 조건화 배지 (EBM2; 캄브렉스)와 함께 인큐베이션함으로써 HUVEC 이동을 시험하였다. 세포를 함유하지 않는 EBM2 배지를 대조군으로서 이용하였다. 15시간 후에, 무세포 영역 내로의 세포 이동을 도립 현미경을 사용하여 기록하였다 (n = 3). 이어서, 사진을 컴퓨터 소프트웨어 패키지 ImageJ 및/또는 MatLab을 이용하여 분석하였다. 영상을 컬러로부터 8-비트 그레이 스케일 영상으로 전환하고, 흑백 영상으로 전환하기 위해 문턱값에 적용하였다. 이어서, 영상을 입자 분석 특징을 사용하여 분석하고, 이를 통해 계수값 (개별 입자의 수), 총 면적, 평균 크기 (개별 입자의), 및 검정에서 내피 이동량에 동등시되는 면적 분율을 비롯하여 화소 밀도 데이터를 얻었다. 세포 이동 정도를 초기에 기록된 상처 라인의 크기에 대해 스코어링하고, 그 결과를 1 x 10⁶개의 세포로 정규화하였다.

[0352] 태반 유래 부착 세포에 의해 분비된 영양 인자는 세포 이동의 유도에 의해 입증되는 바와 같이 내피 세포에 대한 혈관신생 효과를 행사하였다 (도 3).

[0353] 별도의 실험에서, HUVEC를 EGM2 중 확립을 위해 24 웰-플레이트의 하부에서 밤새 배양하고, 이어서 반일 동안 EBM에서 기아 상태로 두었다. 동시에, 배지-배양 PDAC를 해동시키고, 밤새 트랜스웰 (8 μ M)에서 배양하였다. EC 기아 후, 조건화 혈청-무함유 DMEM을 트랜스웰과 함께 EC로 옮기고 밤새 증식시켰다. 각각의 실험은 4 반복으로 이루어지며, 24 시간 후에 증식을 프로메가의 세포 적정 글로 검정으로 평가하였다. EBM-2 배지를 음성 대조군으로서 사용하였고, EGM-2를 양성 대조군으로서 사용하였다. 오차 막대는 분석적 반복실험 (n=3)의 표준 편차를 나타낸다.

[0354] PDAC에 의해 분비된 영양 인자는 HUVEC 세포 수의 증가를 유발하였고, 이는 HUVEC 증식을 나타낸다. 도 4를 참조한다.

[0355] 6.2.3 태반 유래 부착 세포의 혈관신생 효능의 평가를 위한 관 형성

[0356] PDAC를, 일반적으로 세포의 혈관신생 효능뿐만 아니라 세포의 분화 가능성에 대한 VEGF의 효과를 평가하기 위해 VEGF 무함유 성장 배지 또는 VEGF 함유 EGM2-MV 내에서 성장시켰다. 관 형성에 대한 대조 세포로서 HUVEC를 EGM2-MV 내에서 성장시켰다. 세포를 각각의 배지 내에서 70-80% 전면배양물에 도달할 때까지 4 내지 7일 동안 배양하였다. 차가운 (4℃) 매트리지엘™ 용액 (50 μ l; BD 바이오사이언시스)을 12-웰 플레이트의 웰로 분배하고, 플레이트를 60 분 동안 37℃에서 인큐베이션하여 용액을 겔화시켰다. PDAC 및 HUVEC 세포를 트립신 처리하고, 적절한 배지 (VEGF 함유 및 무함유) 중에 재현탁시키고, 100 μ l의 희석시킨 세포 (1 내지 3 x 10⁴ 개 세포)를 각각의 매트리지엘™-함유 웰에 첨가하였다. 0.5 내지 100 ng VEGF의 존재 또는 부재 하에 중합체화된 매트리지엘™ 상의 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 내에 37℃에서 4 내지 24시간 동안 두었다. 인큐베이션 후에, 세포를 표준 광학 현미경을 이용하여 관 형성의 징후에 대해 평가하였다.

- [0357] PDAC는 VEGF의 부재 하에 최소 관 형성을 나타냈지만, VEGF를 사용한 자극을 통해 관-유사 구조체를 형성하도록 유도/분화되었다. 도 5를 참조한다.
- [0358] 6.2.4 태반 유래 부착 세포의 혈관신생 효능 평가를 위한 저산소 반응성
- [0359] 내피 세포 및/또는 내피 전구세포의 혈관신생 기능성을 평가하기 위해, 세포를 저산소 및 정상산소 조건 하에 혈관신생 성장 인자를 분비하는 능력에 관하여 평가할 수 있다. 저산소 조건 하의 배양은 대체로 내피 세포 또는 내피 전구세포에 의한 혈관신생 성장 인자의 증가된 분비를 유도하고, 이는 조건화 배지 내에서 측정될 수 있다. 태반 유래 부착 세포를 그의 표준 성장 배지 중에 동일한 세포수로 플레이팅하고, 대략 70-80% 전면배양률로 성장시켰다. 후속적으로, 세포를 혈청-무함유 배지 (EBM-2)로 교환하고, 24 시간 동안 정상산소 (21% O₂) 또는 저산소 (1% O₂) 조건 하에 인큐베이션하였다. 조건화 배지를 수집하고, 혈관신생 성장 인자의 분비를 상업적으로 이용가능한 ELISA 키트 (R&D 시스템즈)를 사용하여 분석하였다. ELISA 검정을 제조업체의 지침에 따라 수행하였고, 조건화 배지 내의 각각의 혈관신생 성장 인자 (VEGF 및 IL-8)의 양을 1×10^6 개의 세포로 정규화하였다.
- [0360] 태반 유래 부착 세포는 저산소 조건 하에 다양한 혈관신생 성장 인자의 상승된 분비를 나타내었다. 도 6을 참조한다.
- [0361] 6.2.5 PDAC-조건화 배지에 대한 HUVEC 반응
- [0362] PDAC를 48시간 동안 60% DMEM-LG (깁코); 40% MCB2-201 (시그마); 2% FBS (하이클론 랩스), 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 10 ng/mL 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 1 n-텍사메타손 (시그마); 100 μM 아스코르브산 2-포스페이트 (시그마); 10 ng/mL 표피 성장 인자 (알앤디 시스템즈); 및 10 ng/mL 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) (알앤디 시스템즈)를 함유하는 성장 배지 내에서 배양한 후, 추가로 48 시간 동안 혈청-무함유 배지 내에서 배양하였다. PDAC 배양물로부터 조건화 배지를 수집하고, 이를 사용하여 5, 15 및 30분 동안 혈청-기아 HUVEC를 자극하였다. HUVEC를 후속적으로 용해시키고, 혈관신생 경로 신호전달에서 기능을 하는 것으로 공지된 인단백질에 대해 BD™ CBA (세포측정 비드 검정) 셀 시그널링 플렉스 키트(Cell Signaling Flex Kit) (BD 바이오사이언시즈)로 염색하였다. PDAC는 HUVEC에서 AKT-1 (아포토시스 과정을 억제함), AKT-2 (인슐린 신호전달 경로에서 중요한 신호전달 단백질임), 및 ERK 1/2 세포 증식 경로의 강한 활성화제인 것으로 밝혀졌다. 이들 결과는 PDAC의 혈관신생 능력을 추가로 입증한다.
- [0363] 6.3 실시예 3: PDAC에 의한 혈관신생의 유도
- [0364] 본 실시예는 병아리 융모요막 (CAM)을 사용한 생체내 검정에서 상기 실시예 1에 기재된 바와 같은 PDAC가 혈관신생을 촉진한다는 것을 입증한다.
- [0365] 2개의 별개의 CAM 검정을 수행하였다. 제1 CAM 검정에서, 상이한 PDAC 제제로부터의 무손상 세포 펠릿을 평가하였다. 제2 CAM 검정에서, 상이한 PDAC 제제의 상청액을 평가하였다. 섬유모세포 성장 인자 (bFGF)는 양성 대조군으로서, MDA-MB-231 인간 유방암 세포는 참조물로서 사용하였고, 비히클 및 배지 대조군을 음성 대조군으로서 사용하였다. 연구의 종점은 모든 처리군 및 대조군의 혈관 밀도를 결정하는 것이었다.
- [0366] 6.3.1 PDAC를 사용한 CAM 검정
- [0367] 상기 기재된 바와 같이 제조하고 동결보존한 PDAC를 사용하였다. PDAC를 투여를 위해 해동하고, CAM 상에 투여된 세포의 수를 결정하였다.
- [0368] 연구 설계: 연구는 각 군에 10개의 배아를 갖는 5개의 군을 포함하였다. 연구 설계를 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

연구군, 병아리 용모요막 혈관신생 검정

군 번호	배아 수	처리	중점
1	10	비히클 대조군 (PBS/ 매트리젤™ 1:1 (부피 기준) 혼합물 40μl)	혈관 밀도 스코어
2	10	양성 대조군, bFGF로 처리 (DMEM/매트리젤™ 1:1 혼합물 40μl 중 100ng/CAM)	군 1과 동일
3	10	배지 대조군 (DMEM 40μl)	군 1과 동일
4	10	PDAC	군 1과 동일
5	10	MDA-MB-231 세포 P34, 로트 번호 092608	군 1과 동일

[0369]

[0370]

CAM 검정 절차: 신선한 수정란을 표준 난 인큐베이터에서 37°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 제3일에, 난을 멸균 조건 하에 깨고, 배아를 20개의 100 mm 플라스틱 플레이트에 넣고, 저변 선반 상에 물 저장기가 있는 배아 인큐베이터 내에서 37°C에서 배양하였다. 인큐베이터 내의 습도를 일정하게 유지시키도록 작은 펌프를 사용하여 물 저장기 내로 공기를 계속 버블링시켰다. 제6일에, 멸균 실리콘 "0" 고리를 각각의 CAM 상에 놓은 후, 멸균 후드 내에서 PDAC를 7.69×10^5 개 세포/40 μl의 배지/매트리젤™ 혼합물 (1:1)의 밀도로 각각의 "0" 고리 내로 전달하였다. 표 2A 및 2B는 사용된 세포의 수 및 투여를 위해 각각의 세포 표본에 첨가된 배지의 양을 나타낸다. 비히클 대조군 배아에는 40 μl의 비히클 (PBS/매트리젤™, 1:1)을, 양성 대조군에는 40 μl의 DMEM 배지/매트리젤™ 혼합물 (1:1) 중의 100 ng/ml bFGF를, 배지 대조군에는 40 μl의 DMEM 배지만을 투여하였다. 각각의 투여가 종료된 후, 배아를 다시 인큐베이터에 돌려보냈다. 제8일에, 배아를 인큐베이터에서 꺼내고, 실온에서 유지하면서, 100X의 배율에서 영상 캡처 시스템을 이용하여 각각의 "0" 고리 아래에서 혈관 밀도를 결정하였다.

[0371]

혈관 밀도는 CAM 상에서 처리 부위에 존재하는 혈관의 수를 나타내기 위해 산술 수 0 내지 5 또는 지수 수 1 내지 32를 사용한 혈관신생 스코어링 시스템에 의해 측정하였다. 보다 높은 스코어링 수는 보다 높은 혈관 밀도를 나타내는 한편, 0은 혈관신생이 없음을 나타낸다. 각각의 투여 부위에서 억제 %는 각각의 개별 실험에 대한 대조군 샘플로부터 얻은 평균 스코어로 나눈 그 부위에 대해 기록된 스코어를 이용하여 계산하였다. 주어진 화합물의 각각의 용량에 대한 억제 %를 8-10개의 배아로부터 그 용량에 대해 얻어진 모든 결과를 모음으로써 계산하였다.

표 3

투여를 위한 최종 세포 현탁액의 정규화를 위해 각각의 세포 표본에 첨가한 배지의 양

세포주	펠렛 크기	DMEM 및 매트리젤™을 사용한 정규화	세포 현탁액의 최종 부피
PDAC	260 μL	0 μL + 260 μL 매트리젤™	520 μL
MDA-MB-231	40 μL	220 μL + 260 μL 매트리젤™	520 μL

PDAC는 계대배양 6에 사용함

[0372]

[0373]

결과

[0374]

혈관 밀도 스코어의 결과를 도 7에 나타내었다. 결과는 PDAC 세포 현탁액, 또는 100 ng/mL의 bFGF, 또는 MDAMB231 유방암 세포 현탁액으로 처리한 병아리 용모요막의 혈관 밀도 스코어가 비히클 대조군 CAM의 것에 비해 통계적으로 유의하게 더 높았음을 명백하게 나타낸다 ($P < 0.001$, 스튜던트 "t" 검정). PDAC 배양에 사용된 배지 (음성 대조군)는 혈관 밀도에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 또한, PDAC 제제의 혈관 밀도의 유도는 일부 변동을 보였지만, 이러한 변동은 통계적으로 유의하지 않았다.

[0375] 6.3.2 PDAC 상청액을 사용한 CAM 검정

[0376] MDA-MB-231 세포 및 PDAC로부터의 상청액 샘플을 상기 기재된 바와 같은 제2 CAM 검정에 사용하였다. bFGF 및 MDA-MB-231 상청액은 양성 대조군으로서, 배지 및 비히클은 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0377] 연구 설계: 연구는 각 군에 10개의 배아를 갖는 5개의 군을 포함하였다. 연구 설계를 하기 표 4에 기재하였다.

표 4

연구 설계 - 세포 상청액을 사용한 CAM 검정

군 번호	배아 수	처리	종점
1	10	비히클 대조군 (PBS/ 매트리젤™ 1:1 (부피 기준) 혼합물 40 μ l)	혈관 밀도 스코어
2	10	양성 대조군, bFGF로 처리 (DMEM/매트리젤™ 1:1 혼합물 40 μ l 중 100ng/CAM)	군 1과 동일
3	10	배지 대조군 (DMEM 40 μ l)	군 1과 동일
4	10	PDAC의 상청액	군 1과 동일
5	10	MDAMB231 세포의 상청액 (P34)	군 1과 동일

PDAC 상청액은 계대배양 6에서의 세포로부터 얻음.

[0378]

[0379] CAM 검정 절차: 검정 절차는 상기 섹션 6.3.1에 기재된 바와 동일하였다. 유일한 차이는 각각의 줄기 세포 표본 또는 MDA-MB-231 세포로부터의 상청액을 시험 물질로서 사용한 점이다. 투여를 위해, 각각의 상청액을 매트 리젤™과 혼합하고 (1:1 부피), 40 μ l의 혼합물을 각각의 배아에 투여하였다.

[0380] 결과: 혈관 밀도 스코어 (도 8 참조)는 각각의 줄기 세포 표본의 상청액에 의한 혈관 형성의 유도가 상이하였음을 나타낸다. PDAC로부터의 상청액 샘플은 각각 $P < 0.01$, $P < 0.001$ 및 $P < 0.02$ (스튜던트 "t" 검정)로 혈관 유도에 대한 유의한 효과를 보여주었다. 예상된 바와 같이, 양성 대조군 bFGF는 또한 상기 CAM 검정 번호 1에서 보인 것과 같이 강력한 혈관 형성 유도를 보여주었다 ($P < 0.001$, 스튜던트 "t" 검정). 그러나, MDA-MB-231 인간 유방암 세포로부터의 상청액은 비히클 대조군에 비해 혈관 형성에 대해 유의한 유도를 보이지 않았다. 앞서 제시된 바와 같이, 배양 배지 단독으로는 어떠한 효과도 갖지 않았다.

[0381] 6.4 실시예 4: PDAC는 신경보호 효과를 나타낸다

[0382] 본 실시예는 PDAC가 산소-글루코스 결핍 (OGD) 손상 검정을 이용할 때 저-산소 및 저-글루코스 조건에서 신경보호 효과를 갖고, 반응성 산소 종을 감소시킴을 입증한다. 따라서, 이들 결과는 PDAC가 허혈성 병태, 예를 들어 뇌졸중 또는 말초혈관 질환을 치료하는데 유용할 것이고, 허혈성 병태로 인해 생기는 재관류 손상에 대해 보호할 것임을 나타낸다.

[0383] 인간 뉴런 (사이언셀(ScienCel), 카탈로그 # 1520)을 제조업체의 권장사항에 따라 배양하였다. 간단히 설명하면, 배양 용기를 37°C에서 1시간 동안 멸균 증류수 중의 폴리-L-리신 (2 μ g/mL)으로 코팅하였다. 용기를 이중 증류된 H₂O로 3회 세척하였다. 뉴런 배지 (사이언셀)를 용기에 첨가하고, 인큐베이터 내에서 37°C로 평형화시켰다. 뉴런을 해동하고, 원심분리 없이 용기에 직접 첨가하였다. 후속적인 배양 동안, 배지를 배양 개시 다음 날 교환하고, 그 후 이틀마다 교환하였다. 뉴런은 전형적으로 제4일까지 손상에 대해 준비된다.

[0384] OGD 배지 (둘베코 변형 이글 배지-글루코스 무함유)를 부분적으로 액체 배지 중 산소 용해도를 감소시키기 위해 먼저 배지를 수조 내에서 가온함으로써 제조하였다. 용존 산소를 제거하기 위해, 100% 질소를 0.5 μ m 확산석을 사용하여 배지를 통해 30분 동안 버블링하였다. HEPES 완충제를 1 mM의 최종 농도로 첨가하였다. 폭기 종료시, 배지를 뉴런에 직접 첨가하였다. 소량의 배지 샘플을 분취하여, 침액형 산소 센서를 통해 산소 수준을 확인하였다. 산소 수준은 전형적으로 0.9% 내지 약 5.0% 산소로 감소되었다.

[0385] 기체 처리 전에 챔버를 37°C에서 인큐베이터 내에 적어도 4시간 동안 (바람직하게는 밤새) 놓음으로써 저산소 챔버를 제조하였다. 배양 용기 내의 배지를 제거하고 탈기시킨 배지로 교체하고, 배양 용기를 저산소 챔버에 넣었다. 이어서, 저산소 챔버를 시스템을 통해 20-25 Lpm의 속도로 적어도 5분 동안 95% N₂/5% CO₂ 기체로 플

러싱하였다. 시스템을 37℃에서 인큐베이터 내에서 4시간 동안 인큐베이션하면서, 챔버를 1시간 후 1회 더 탈기시켰다.

[0386] 손상 절차 종료시에, OGD 배지를 흡인시키고, 가온 배지를 뉴런에 첨가하였다. 24-28시간 후에, PDAC 및 뉴런을 6-웰 플레이트의 웰 당 각각 100,000개의 세포로 동일한 수로 플레이팅하고, 뉴런 배지를 뉴런에 첨가하고, 6일 동안 공동-배양하였다.

[0387] 각각의 조건에 대해 6-웰 플레이트 내의 무작위 필드의 현미경 사진을 찍었다. 전형적인 뉴런 형태를 갖는 세포를 확인하고, 신경돌기 길이를 기록하였다. 신경돌기의 평균 길이는 뉴런 건강과 양성으로 상호관련되고, 뉴런 및 PDAC의 공동-배양물에서 더 길었으며, 이것은 PDAC가 세포를 손상으로부터 보호하였음을 나타낸다.

[0388] 반응성 산소 종 검정

[0389] PDAC는 저산소 동안 슈퍼옥사이드 디스무타제, 카탈라제 및 헴 옥시게나제 유전자를 발현하는 것으로 결정되었다. 반응성 산소 종을 제거하고 세포를 이러한 산소종으로부터 보호하는 PDAC의 능력을 반응성 산소 종 발생제로서 과산화수소를 사용하는 검정에서 결정하였다.

[0390] 검정 설명: 표적 세포 (성상세포; 사이언셀 리서치 레보라토리즈(ScienCell Research Laboratories))를 폴리-L-리신으로 예비-코팅된 96-웰 흑색 웰 플레이트에 $6000/\text{cm}^2$ 로 접종하였다. 성상세포를 5% 이산화탄소를 이용하여 37℃에서 성장 배지 내에서 밤새 부착시켰다. 다음날, 배양 배지를 제거하고, 세포를 형광생성 프로브인 세포 투과성 염료 DCFH-DA (디클로로플루오레세인 디아세테이트)와 함께 인큐베이션하였다. 잉여 염료는 돌베코 인산염 완충 염수 또는 헵크 완충 염 용액으로 세척하여 제거하였다. 이어서, 30-60분 동안 1000 μM 과산화수소를 첨가함으로써 반응성 산소 종을 사용하여 세포를 손상시켰다. 이어서, 과산화수소 함유 배지를 제거하고, 혈청 무함유, 글루코스 무함유 성장 배지로 교체하였다. PDAC를 $6000/\text{cm}^2$ 로 첨가하고, 세포를 추가로 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 표준 형광 플레이트 판독기에서 480Ex 및 530Em에서 판독하였다. 배지의 반응성 산소 종 함량은 세포의 세포질액 내의 DCFH-DA 수준에 정비례하였다. 반응성 산소 종 함량은 예비-결정된 DCF 표준 곡선에 비교하여 측정하였다. 모든 실험은 N=24로 수행하였다.

[0391] 검정을 위해, 20X DCFH-DA 원액을 태아 소 혈청 무함유의 세포 배양 배지 내에 1X로 희석하고 균질하도록 교반함으로써 1X DCFH-DA를 사용 직전에 제조하였다. 과산화수소 (H_2O_2) 희석액은 필요한 경우에 DMEM 또는 DPBS 중에서 제조하였다. 표준 곡선은 1 mM DCF 표준물을 세포 배양 배지 내에 희석하고, 100 μl 의 DCF 표준물을 형광 측정에 적합한 96 웰 플레이트에 옮기고, 100 μl 의 세포 용해 완충제를 첨가함으로써, 0 μM 내지 10 μM 의 농도 범위에서 1:10 희석 시리즈로서 작성하였다. 형광을 480Ex 및 530Em에서 판독하였다.

[0392] 결과: PDAC는 반응성 산소 종의 농도를 성상세포 공동-배양물에서 유의하게 감소시켰다. 도 9를 참조한다.

[0393] 6.5 실시예 5: 태반 줄기 세포를 사용하는 치료 방법

[0394] 6.5.1 심근경색의 치료

[0395] 50대 중반의 남성 개체가 20분 초과 동안 좌측 팔로 방사상으로 퍼지는 흉통, 숨가쁨, 오심, 심계항진, 발한을 나타냈다. 심전도 결과 및 크레아틴 키나제의 혈액 농도의 등락을 이용하여, 심장의 전방벽의 심근경색 (통벽성)의 감별 진단이 이루어졌다. 개체를 니트로글리세린 및 스트렙토키나제로 안정화시킨 후에, 개체에게 0.9% 염수 중 1×10^8 내지 5×10^8 개의 CD10^+ , CD34^+ , CD105^+ , CD200^+ 태반 줄기 세포 (PDAC)를 국소 마취제가 있는 심장 주사기를 사용하여 이환된 영역에 직접 투여하였다. 개체를 이후 72시간 동안 응급상황에 기초하여 모니터링하였다. 개체를 경색 영역의 혈관재형성 정도를 평가하기 위해 심전도 및/또는 염료 시각화 기술에 의해, 치료 후 3개월에 걸쳐 추가로 모니터링하였다. 심전도 결과가 PDAC의 투여 전보다 식별가능하게 정상에 가까운 경우에 또는 시각화시 경색 영역이 식별가능하게 혈관재형성되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0396] 6.5.2 심근병증의 치료

[0397] 개체가 무호흡, 다리 및 발목 종창, 및 불규칙한 심박을 나타냈다. 다른 원인을 배제한 후, 확증적 심전도를 사용하여 심근병증의 진단이 이루어졌다. 초음파 영상에 의해 개체가 울혈성 심근병증이 있음을 확인하였다. 개체에게 0.9% 염수 중 1×10^8 내지 5×10^8 개의 CD10^+ , CD34^+ , CD105^+ , CD200^+ 태반 줄기 세포를 국소 마취제가 있는 심장 주사기를 사용하여 심장 동맥에 직접 투여하였다. 보다 정상적인 혈류를 나타내는 초음파 영상 판독치에서의 변화에 대해, 그리고 무호흡 감각의 개선과 다리 및 발목 종창의 감소에 대해 다음 3개월에 걸쳐

개체를 모니터링하였다. 임의의 이들 징후가 모니터링 기간 동안 개선을 보이는 경우에 개체에 대한 치료 유효성이 확립된다.

[0398] 6.5.3 말초 혈관 질환의 치료

[0399] 개체는 매달릴 때 붉게 변하는 시리고 저린 발, 및 다리의 통증, 약화 및 피로를 나타냈다. 당뇨병을 배제한 후, 말초 동맥 질환의 진단이 이루어졌다. 개체에게 450 mL 0.9% 염수 중 1×10^9 내지 5×10^9 개의 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기 세포를 정맥내 투여하고, 이후 3개월 동안 격주로 모니터링하였다. 상기 설명된 임의의 증상이 모니터링 기간 동안 개선되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0400] 6.5.4 말초 혈관 질환의 치료

[0401] 개체는 매달릴 때 붉게 변하는 시리고 저린 발, 및 다리의 통증, 약화 및 피로를 나타냈다. 당뇨병을 배제한 후, 말초 동맥 질환의 진단이 이루어졌다. 개체에게 5 mL 0.9% 염수 중 1×10^8 내지 5×10^8 개의 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기 세포를 근육내 투여하고/거나 동등한 양을 발가락 사이에 국소적으로 정맥내 또는 동맥내 투여하고, 이후 3개월 동안 격주로 모니터링하였다. 상기 설명된 임의의 증상이 모니터링 기간 동안 개선되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0402] 6.5.5 말초 혈관 질환의 조합 치료

[0403] 개체는 매달릴 때 붉게 변하는 시리고 저린 발, 및 다리의 통증, 약화 및 피로를 나타냈다. 당뇨병을 배제한 후, 말초 동맥 질환의 진단이 이루어졌다. 개체에게 450 mL 0.9% 염수 중 1×10^9 내지 5×10^9 개의 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기 세포를 정맥내 투여하고, 이후 3개월 동안 격주로 모니터링하였다. 개체는 또한 실로스타졸 100 mg을 1일 2회 복용하도록 처방받았다. 상기 설명된 임의의 증상이 모니터링 기간 동안 개선되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0404] 6.5.6 말초 혈관 질환의 조합 요법

[0405] 개체는 매달릴 때 붉게 변하는 시리고 저린 우측 발, 및 우측 다리의 통증, 약화 및 피로를 나타냈다. 당뇨병을 배제한 후, 말초 동맥 질환의 진단이 이루어졌다. 개체를 혈관성형술 및 대퇴 동맥 내에 스텐트를 삽입하는 수술로 치료하였다. 후속적으로, 개체에게 450 mL 0.9% 염수 중 1×10^9 내지 5×10^9 개의 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기 세포를 정맥내 투여하고, 이후 3개월 동안 격주로 모니터링하였다. 상기 설명된 임의의 증상이 모니터링 기간 동안 개선되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0406] 6.5.7 PDAC를 사용한 줄종의 치료

[0407] 52세의 남성이 신체의 좌측면에 반신마비, 및 부분 실어증을 나타냈다. 허혈성 뇌졸중의 진단이 이루어졌다. 자기 공명 영상화를 이용하여 허혈 영역을 위치결정한 후, 개체를 이환된 측면 상에서 두개골 내에 개구부를 생성하기 위한 수술을 위해 준비하였다. 개구부가 만들어진 후, 1-2 mL 0.9% 염수 용액 중 5×10^7 내지 1×10^8 개의 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기 세포를 허혈 영역에 투여하였다. 개체를 다음 7-14일에 걸쳐 뇌졸중, 특히 반신마비 또는 실어증의 임의의 증상의 개선 징후에 대해 모니터링하였다. 상기 설명된 임의의 증상이 모니터링 기간 동안 개선되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0408] 6.5.8 PDAC를 사용한 줄종의 치료

[0409] 52세의 남성이 신체의 좌측면에 반신마비, 및 부분 실어증을 나타냈다. 허혈성 뇌졸중의 진단이 이루어졌다. 자기 공명 영상화를 이용하여 허혈 영역을 위치결정한 후, 개체를 이환된 측면 상에서 두개골 내에 개구부를 생성하기 위한 수술을 위해 준비하였다. 개구부가 만들어진 후, 450 mL 0.9% 염수 용액 중의 1×10^9 내지 5×10^9 개의 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기 세포를 정맥내 투여하였다. 개체를 다음 7-14일에 걸쳐 뇌졸중, 특히 반신마비 또는 실어증의 임의의 증상의 개선 징후에 대해 모니터링하였다. 상기 설명된 임의의 증상이 모니터링 기간 동안 개선되는 경우에 치료 유효성이 확립된다.

[0410] 등가물:

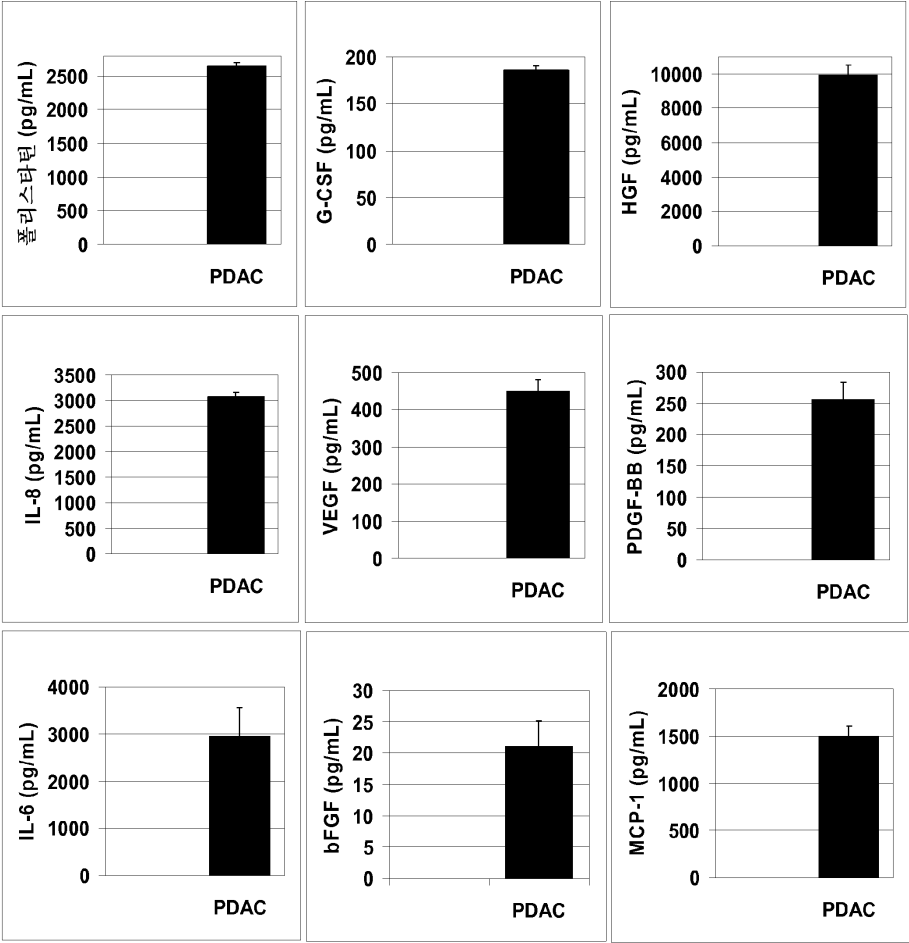
[0411] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 실시양태에 의해 그 범위가 제한되지 않아야 한다. 실제로, 기재된 것에 이

외에도, 본원에 제공된 내용의 다양한 변형이 상기 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

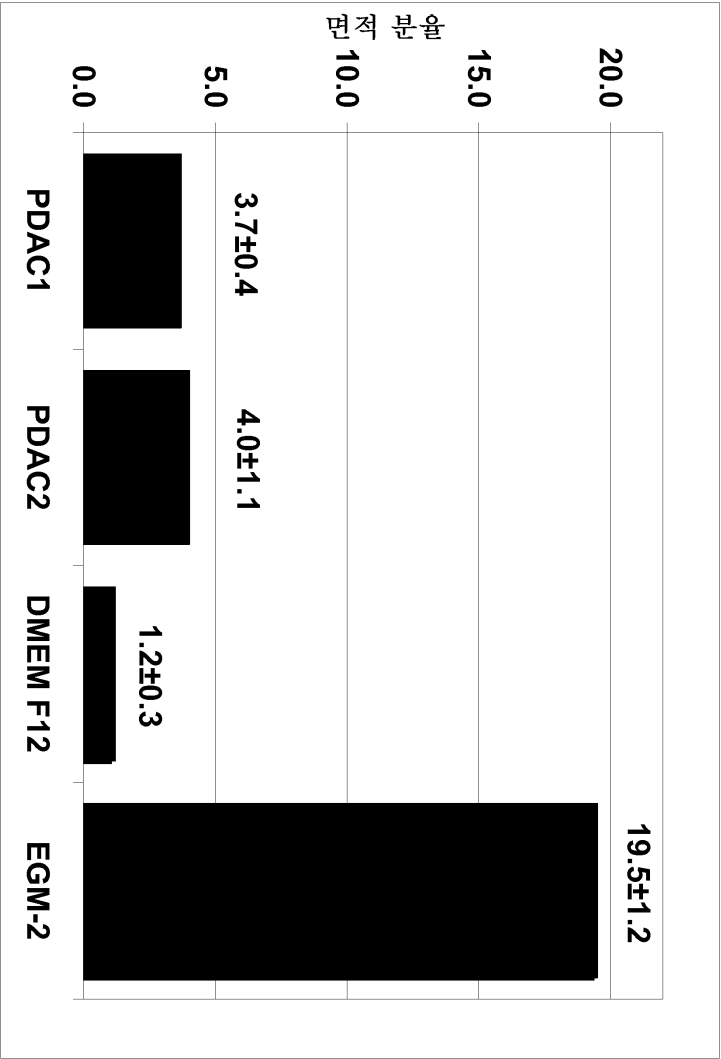
[0412] 다양한 공보, 특허 및 특허 출원이 본원에서 인용되고, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

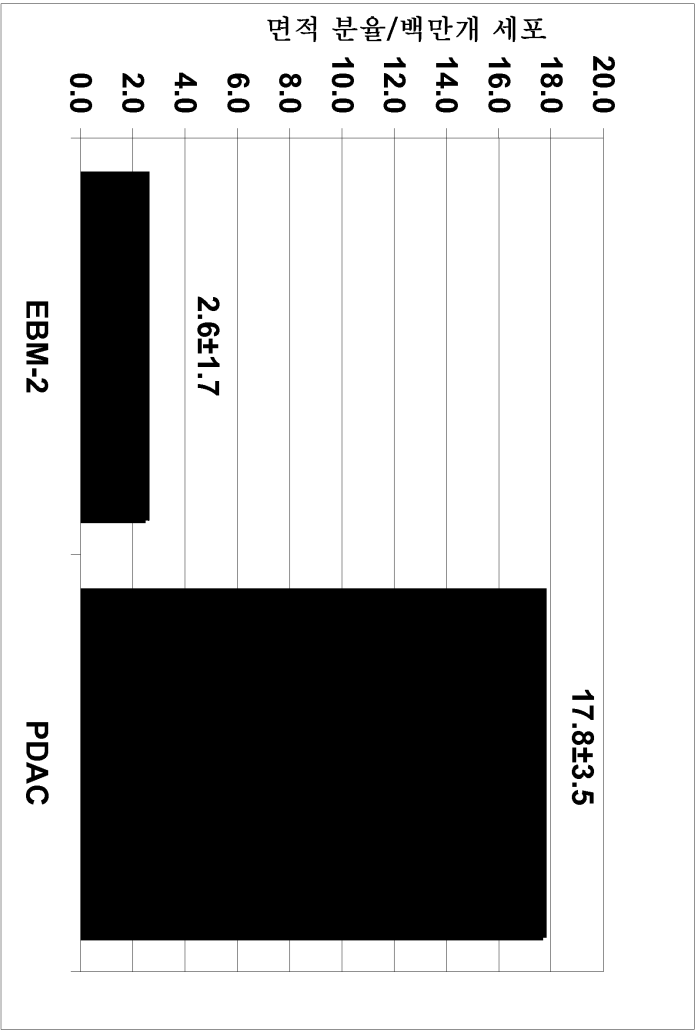
도면1



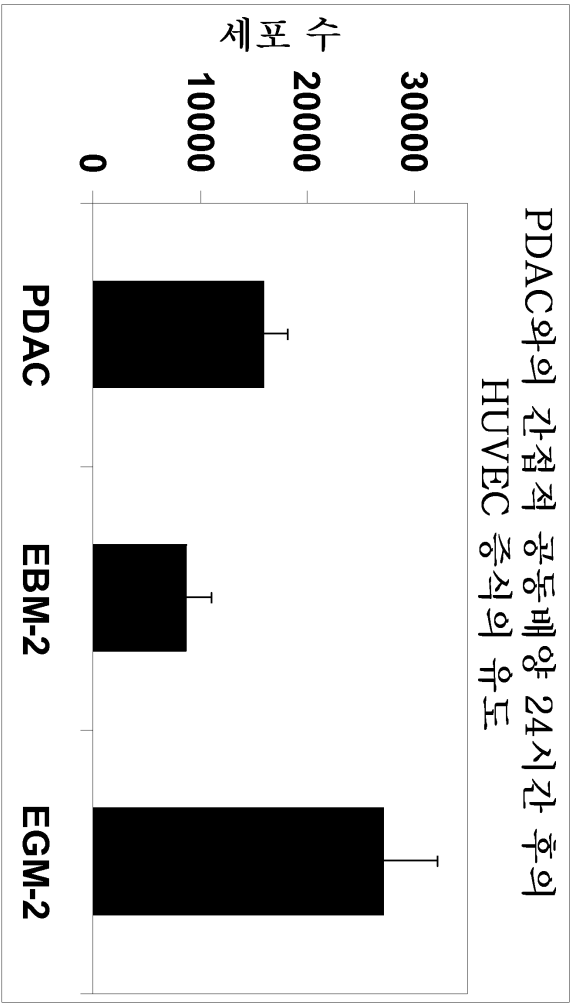
도면2



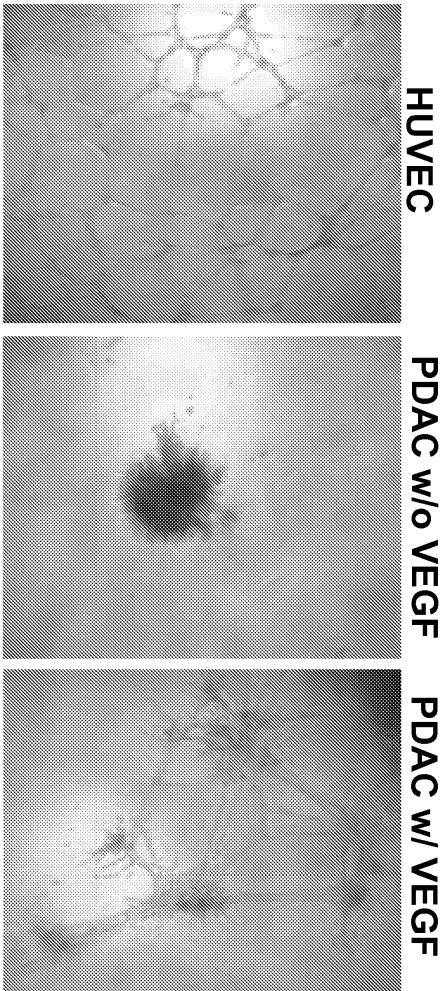
도면3



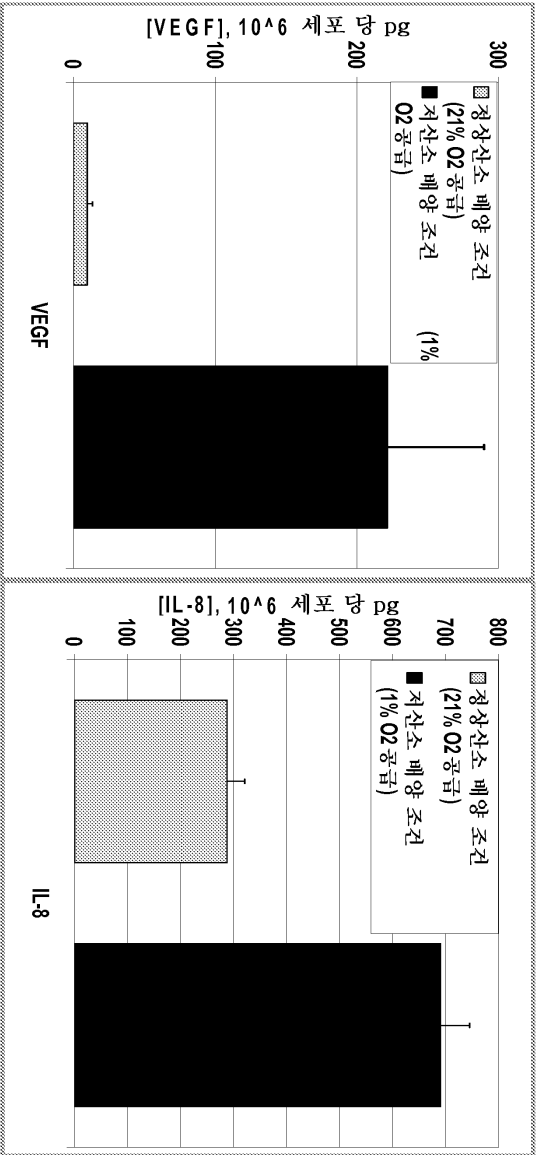
도면4



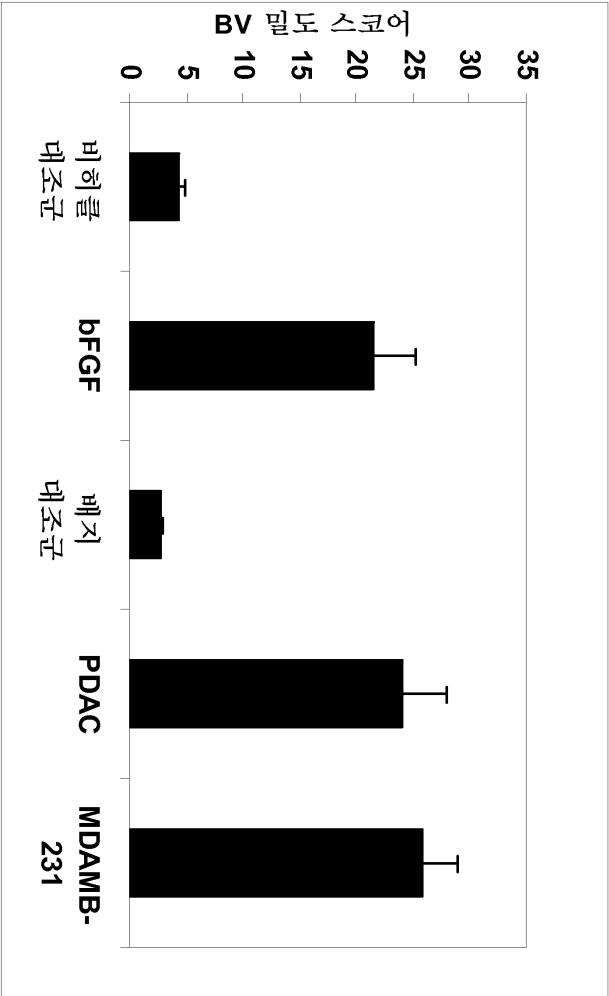
도면5



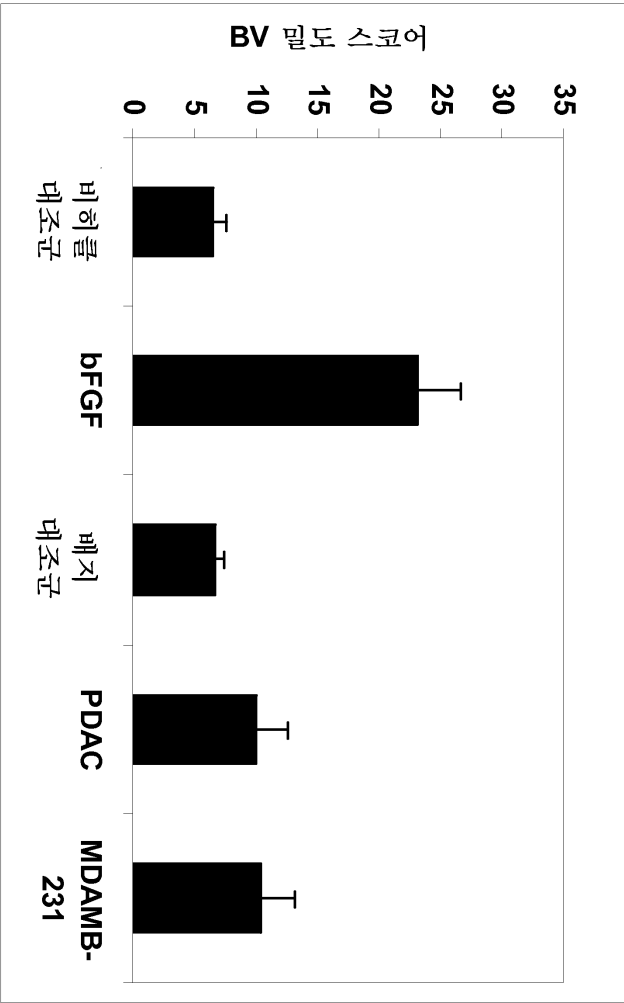
도면6



도면7



도면8



도면9

