



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월05일

(11) 등록번호 10-1438554

(24) 등록일자 2014년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/07 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7004531

(22) 출원일자(국제) 2007년08월06일

심사청구일자 2012년07월26일

(85) 번역문제출일자 2009년03월03일

(65) 공개번호 10-2009-0111800

(43) 공개일자 2009년10월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/017622

(87) 국제공개번호 WO 2008/019148

국제공개일자 2008년02월14일

(30) 우선권주장

11/888,926 2007년08월03일 미국(US)

60/835,627 2006년08월04일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Beltrami 외, Cell 114(6):763~766 (2003)

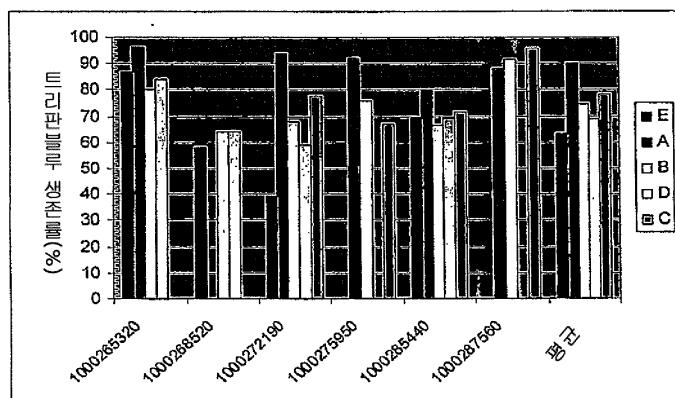
전체 청구항 수 : 총 39 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 태반 줄기세포를 이용한 종양 억제

(57) 요 약

본 발명은 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군을 이용하여 종양 세포 증식과 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 종양 억제 효과를 기준으로 태반 세포와 태반 세포군을 생산하고 선별하는 방법을 제공하고 그러한 세포와 세포군을 함유하는 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자

하르바체우스키, 리호

미국, 뉴저지 07032, 키니, 289 아이비 스트리트

머레이, 로즈앤

미국, 뉴저지 07028, 글랜 럿지, 28에스 헤르만 스
트리트

하리리, 로버트 제이.

미국, 뉴저지 07924, 베르나르드스빌레, 341 멘드
햄 로드

특허청구의 범위

청구항 1

복수의 부착성 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 및 $CD200^+$ 태반 줄기세포를 복수의 종양 세포와 접촉시키는 단계를 포함하되, 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 상기 종양 세포와 비교할 때, 이러한 접촉은 상기 태반 줄기세포가 상기 복수의 종양 세포의 증식을 억제하기에 충분한 시간동안 이루어지며, 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막모세포종 세포 또는 폐암종 세포인, 인비트로(*in vitro*) 상에서 복수의 종양 세포 증식을 억제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 종양 세포는 고형 종양의 일부인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 태반 줄기세포의 적어도 일부는 사이토킨을 발현하도록 유전자 조작된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 사이토킨은 IFN- β 또는 IL-2인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 종양 세포를 하나 또는 그 이상의 항암 화합물과 접촉시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 종양 세포를 복수의 중간엽 줄기세포와 접촉시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 30회 이하의 배증 과정을 통해 인비트로(*in vitro*) 상에서 증식된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 10회 이하의 배증 과정을 통해 인비트로(*in vitro*) 상에서 증식된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 냉동 보존되고 상기 접촉 전에 해동되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 상기 종양 세포 증식을, 상기 태반 줄기세포의 부재하에서 같은 수의 종양 세포가 증식하는 경우와 비교하였을 때, 적어도 50% 억제하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 상기 종양 세포 증식을, 상기 태반 줄기세포의 부재하에서 같은 수의 종양 세포가 증식하는 경우와 비교하였을 때, 적어도 75% 억제하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 접촉 전에 상기 태반 줄기세포가 시료(sample) 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제하는지 여부를 판별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 시료 종양 세포는 상기 태반 줄기세포와 접촉하게 되는 종양 세포와 같은 조직에서 유래한 종양 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 시료 종양 세포는 한 개체의 종양 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 판별하는 단계는 상기 시료 종양 세포가 상기 태반 줄기세포와의 직접 접촉에 의하여 검출 가능한 정도로 억제되는지를 판별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 판별하는 단계는 상기 태반 줄기세포와 상기 시료 종양 세포 간의 직접 접촉 없이 상기 태반 줄기세포에 의하여 상기 시료 종양 세포가 검출 가능한 정도로 억제되는지를 판별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 18

복수의 부착성 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺ 태반 줄기세포를 포함하되, 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교할 때, 충분한 시간 동안 접촉하면 상기 복수의 종양 세포의 증식을 억제하며, 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막모세포종 세포 또는 폐암종 세포인, 복수의 종양 세포 증식 억제용 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 종양 세포는 고형 종양의 일부인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 조성물은 포유류에게 정맥 투여하기에 적합한 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 조성물은 포유류 속 종양 자리(site) 또는 그 부근에 투여하기에 적합한 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 포유류는 사람인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 태반 줄기세포의 적어도 일부는 사이토킨을 발현하도록 유전자 조작된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 사이토킨은 IFN-β 또는 IL-2인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 25

제18항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 항암 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 26

제18항에 있어서, 복수의 중간엽 줄기세포를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 28

제18항에 있어서, 적어도 1×10^7 개의 태반 줄기세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 29

제18항에 있어서, 적어도 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 30

제18항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 30회 이하의 배증 과정을 통해 인비트로(*in vitro*) 상에서 증식된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 31

제18항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 10회 이하의 배증 과정을 통해 인비트로(*in vitro*) 상에서 증식된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 32

제18항에 있어서, 상기 태반 줄기세포는 냉동 보존되고 상기 접촉 전에 해동되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 33

제18항에 있어서, 상기 조성물은 상기 종양 세포 증식을, 상기 조성물의 부재하에서 같은 수의 종양 세포가 증식하는 경우와 비교하였을 때, 적어도 50% 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 34

제18항에 있어서, 상기 조성물은 상기 종양 세포 증식을, 상기 조성물의 부재하에서 같은 수의 종양 세포가 증식하는 경우와 비교하였을 때, 적어도 75% 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 35

제18항에 있어서, 상기 조성물 내 태반 줄기세포가 시료(sample) 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제하는 것으로 판별된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 시료 종양 세포는 상기 태반 줄기세포와 접촉하게 되는 종양 세포와 같은 조직에서 유래한 종양 세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 시료 종양 세포는 한 개체의 종양 세포인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 조성물 내 태반 줄기세포가 상기 태반 줄기세포와 직접 접촉한 시료 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제하는 것으로 판별된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 조성물 내 태반 줄기세포가 상기 태반 줄기세포와 상기 시료 종양 세포 간의 직접 접촉

없이 시료 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제하는 것으로 판별된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 태반 줄기세포를 이용하여 종양 세포의 증식과 종양의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 종양 세포 증식과 종양 성장 억제를 위한 태반 줄기세포를 함유하는 조성물을 제공하고, 종양 억제 효과가 있는 태반 줄기세포의 분리된 세포군과 그러한 세포군을 제조하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002]

사람 줄기세포는 여러 종류의 성숙한 세포 계통을 생성할 수 있는 전능성(totipotent)이거나 다능성(pluripotent)인 전구세포(precursor cell)이다. 줄기세포는 모든 조직이 아니라면 수많은 조직을 재형성하고, 생체적·해부학적 기능을 되살리는데 쓰일 수 있다는 것을 밝혀주는 증거들이 있다.

[0003]

수많은 서로 다른 포유류 줄기세포들의 특성이 분석된 바 있다. 예를 들어 Caplan 외 미국 특허 제5,486,359호(사람 중간엽 줄기세포), (Boyse 외 미국 특허 제5,004,681호(태아와 신생아 조혈 줄기세포와 전구세포)), (Boyse 외 미국 특허 제5,192,553호(상동)), (Beltrami 외, *Cell* 114(6):763~766 (2003) (심근 줄기세포)), (Forbes 외, *J. Pathol* 197(4):510~518 (2002) (간 줄기세포)를 보라. 제대혈과 제대혈에서 유래한 모든 유핵세포는 절제 시술을 받은 환자들의 조혈 기능을 완전히 또는 부분적으로 회복하기 위한 이식에 쓰인 바 있다.

[0004]

태반은 줄기세포원으로서 특히 매력적이다. 포유류 태반은 풍부하고 보통 의료 폐기물로 버려지기 때문에 의학적으로 유용한 줄기세포원으로서 독특한 자리를 차지하고 있다.

[0005]

최근 골수 유래 중간엽 줄기세포는, 유전자 조작을 받았을 때, 몇몇 종양 세포로 이동하고 침투하는 능력을 지니게 된다는 것이 밝혀졌다. 예를 들어 Hung 외, "Mesenchymal Stem Cell Targeting of Microscopic Tumors and Tumor Stroma Development Monitored by Noninvasive *In vivo* Positron Emission tomography Imaging," *Clin. Cancer Res.* 11(21):7749~7756 (2005)를 보라. 일부 유전자 조작 골수 유래 중간엽 줄기세포주는 종양 성장 억제능을 가진다고 밝혀졌다. 예를 들어, Studney 외, "Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon- β Delivery into Tumors," *Cancer Res.* 62:3603~3608 (2002) (흑색암종 세포주), (Nakamura 외, "Antitumor Effect of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells in a Rat Glioma Model," *Gene Therapy* 11:1155~1164 (2004)(중간엽 줄기세포가 재조합 IL-2를 발현함)를 보라. 중간엽 줄기세포는 그러나 생체 내에서 적어도 한 종류의 종양 성장을 촉진한다고 밝혀져 있다. Zhu 외, "Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Favor Tumor Cell Growth In Vivo," *Exp. Mol. Pathol.*(간행 전의 전자 출판, 2005)(대장 선암종 세포)를 보라.

[0006]

하지만 현재까지 태반 유래 줄기세포에 종양 성장을 억제하거나 종양 세포 증식을 억제하는 능력이 있다고 기술한 바는 없다. 본 발명은 태반 줄기세포와 그 줄기세포군을 이와 같이 이용하는 용도를 제공한다.

발명의 상세한 설명

[0007]

발명의 요약

[0008]

본 발명에서는 태반 줄기세포, 태반 줄기세포군(placental cell population)과 태반 줄기세포를 포함하는 조성물을 이용하여 종양 세포 증식과 종양의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 태반 줄기세포 함유 조성물을 포함하여 종양 세포 증식 억제 효능을 지니는 조성물을 제공한다. 본 발명은 나아가 종양 세포 증식을 억제하는 능력에 따라 선택된 태반 줄기세포군을 제공하고, 이러한 능력을 갖춘 조성물도 제공한다.

[0009]

본 발명의 한 측면에서는 복수의 태반 줄기세포와 복수의 종양 세포를 접촉시키되, 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포 증식을 검출 가능한 정도로 상기 태반 줄기세포가 억제하기에 충분한 시간 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 복수의 종양 세포 증식의 억제 방법을 제공한다. 한 특정 실시 태양에서 상기 종양 세포는 고형 종양의 일부를 이룬다. 다른 특정 태양에서 상기 종양 세포는 비고형의 종양 세포 형태를 취한다. 다른 특정 태양에서, 상기 종양 세포는 조직구 림프종(histiocytic lymphoma) 세포, 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML), 급성 T-세포 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 대장 선암종(colon adenocarcinoma) 세포, 망막 모세포종(retinoblastoma) 또는 폐암종 세포이다. 다른 특정 태양에서 상기 접촉은 시험관 내에서 이루어진다. 다른 특정 태양에서 상기 접촉은 한 개체의 생체 내에서 이루어진다. 그 개체는 포유류, 예를 들어 사람일 수 있다. 다른 특정 태양에서 상기 태반 줄기세포는 상기 개체에 대하여 HLA 일치한다. 다른 특정 태양에서 상기 태반 줄기세포는 상기 개체에

HLA 일치하지 않는다. 다른 더 구체적인 태양에서, 상기 접촉은 상기 태반 세포를 상기 개체에 정맥하 투여하는 단계를 포함한다. 다른 더 구체적인 태양에서, 상기 접촉은 상기 개체의 종양 부위 또는 그 근처로 상기 태반 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD200과 HLA-G를 발현), (CD73, CD105와 CD200을 발현), (CD200과 OCT-4를 발현), (CD73, CD105와 HLA-G를 발현), (CD73과 CD105를 발현하고 배아유사체(embryoid-like body)의 형성이 가능한 조건하에서 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체의 형성을 촉진 및/또는 OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체의 형성을 촉진한다.

[0010] 다른 특정 실시 태양에서, 상기 복수의 태반 줄기세포 중 적어도 일부는 사이토킨을 발현하도록 유전자 조작된 것이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 사이토킨은 IFN- β 또는 IL-2이다.

[0011] 다른 특정 태양에서, 본 방법은 상기 종양 세포를 하나 이상의 항암 화합물에 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 다른 특정 태양에서 상기 방법은 상기 종양 세포를 복수의 중간엽 줄기세포, 예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포에 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 다른 구체적 태양에서 본 방법은 상기 종양 세포를 복수의 섬유모세포에 접촉시키는 단계를 더 포함한다.

[0012] 다른 구체적 태양에서 본 방법은 상기 종양 세포를 하나 이상의 세포 화학유인 물질(chemoattractant)에 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 더 구체적인 태양에서 이 화학유인 물질은 베倜질 유래 인자-1(stromal derived factor-1, SDF-1)이다.

[0013] 본 발명의 방법은 예를 들어, 한 개체 내에서 종양 세포 증식 또는 종양의 성장을 검출할 수 있는 정도로 억제하기 위하여 필요한 태반 줄기세포라면 그 수가 얼마든지 쓸 수 있다. 예를 들어 복수의 종양 세포와 접촉하는데 쓰이는 복수의 태반 줄기세포는 약 1×10^5 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^6 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^7 개의 태반 줄기세포, 또는 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포 또는 이보다 많은 세포를 함유할 수 있다. 많은 더 구체적인 실시 태양에서 본 발명의 방법은 상기 개체에 적어도 약 1×10^5 , 적어도 약 1×10^6 , 적어도 약 1×10^7 , 또는 적어도 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다. 더욱 구체적인 많은 태양에서, 이 방법은 개체 속의 종양 세포의 수보다 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배 또는 5배보다 더 많은 수의 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다. 개체 속 종양 세포의 수를 측정하기 이 분야에서 알려진 모든 방법을 사용할 수 있다. 종양 세포 정량을 위한 예시 방법은 미국 특허 제6,365,362호와 6,645,731호, Mehes 외, *Haematologia* 31(2):97~109 (2001)와 Hardingham 외, *Cancer Research* 53:3455~3458(1993)을 들 수 있는데, 이들 문헌의 내용 전부는 본 명세서의 참고 문헌이다. 더 구체적인 수많은 실시 태양에서 본 발명의 방법은 개체 체중을 기준으로 하여 다수의 태반 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어 이 방법은 대략 kg 당 1×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^7 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 kg 당 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 많은 더 구체적인 실시 태양에서, 본 방법은 상기 개체에 kg 당 적어도 약 1×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^7 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 kg 당 적어도 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 본 발명의 더 구체적인 태양 중 여러 경우에서, 상기 태반 줄기세포는 시험관내에서 세포수 배증을 30회 이하, 20회 이하, 10회 이하 또는 5회 이하로 하여 증식해 온 것이다. 다른 구체적인 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 냉동 보존한 다음 상기 접촉 전에 해동한 것이다. 본 방법의 더 구체적인 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 상기 태반 줄기세포의 부재하에 있는 같은 수의 종양 세포의 증식과 비교하였을 때, 시험관내에서 종양 세포 증식을 예를 들어, 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제하는 것으로 확인된 세포이다.

[0015]

다른 구체적인 태양에서, 본 발명의 방법은 상기 태반 줄기세포를 상기 개체에 투여하기 전에, 상기 태반 줄기세포가 종양 세포 성장을 억제하는 효능을 지니는지 여부를 결정하는 단계를 더 포함하는데, 예를 들어 상기 태반 줄기세포가 대표적인 종양 세포 시료의 증식을 검출할 수 있는 정도로 억제하는지 선별하는 단계이다. 본 발명의 더 구체적인 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 상기 개체에 투여하기 전에, 상기 태반 줄기세포의 부재하에 있는 같은 수의 종양 세포의 증식과 비교하였을 때, 시험관내에서 종양 세포 증식을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제하는 것으로 확인된 세포이다. 몇몇 태양에서는 상기 태반 줄기세포를 종양 세포를 가지는 개체에 투여하기 전에, 상기 줄기세포가 종양 세포 증식을 직접 접촉에 의하여, 비직접 접촉(예를 들어 가용성 인자를 통해)에 의하여 또는 양쪽 모두에 의하여 억제하는지를 결정한다. 예를 들어, 본 방법의 특정 태양에서는 상기 태반 줄기세포를 상기 개체에 투여하기 전에, 상기 태반 줄기세포가 시험관 내에서 종양 세포의 증식을 억제하는지, 예를 들어, 직접 배양 분석(direct culture assay), 예를 들어 트랜스웰 분석(transwell assay), 또는 더 바람직하게는 직접 배양 분석과 트랜스웰 분석 양쪽에서 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 억제하는지를 측정한다. 다른 구체적인 태양에서는 본 발명에 따라 상기 태반 줄기세포를 투여받을 개체에 내재하는 종양 세포와 동일, 예를 들어 평평 상피세포 등의 동일한 세포 유형, 예를 들어 가슴, 전립선 등의 동일한 조직, 또는 더 바람직하게는, 세포 유형과 조직이 모두 동일한 곳에서 유래한 종양 세포를 대상으로, 상기 태반 줄기세포가 종양 세포의 증식 또는 종양 성장을 시험관내에서 억제할 수 있는지에 대해서 선별한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 개체의 생검에서 얻은 종양 세포 또는 상기 개체의 혈액 시료에서 분리 또는 정제한 종양 세포를 상대로, 시험관내 종양 성장 억제능을 지니는 세포를 상기 태반 줄기세포 중에서 선별한다. 본 방법의 더 구체적인 여러 태양에서는 상기 태반 줄기세포가 양막, 융모막, 양막-융모막(amnion-chorion), 탯줄 또는 태반 관류액에서 유래할 수 있는 세포이고, 또 상기 개체에 투여하기 전에, 상기 태반 줄기세포의 부재하에 있는 같은 수의 종양 세포의 증식과 비교하였을 때, 시험관내에서 종양 세포 증식을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제하는 것으로 확인된 세포들이다.

[0016]

본 발명은 나아가 복수의 종양 세포, 예를 들어 혈액암 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 복수의 태반 줄기세포를 배양하여 얻은 조건 배양 배지(conditioned culture medium) 또는 상충액을 함유하는 조성물과 상기 복수의 종양 세포를 접촉시키는데 이 접촉은 상기 조건 배양 배지 또는 상충액이 상기 복수의 종양 세포의 증식 또는 억제를, 상기 조건 배양 배지 또는 상충액에 접촉하지 않은 복수의 종양 세포들과 비교하였을 때 검출할 수 있는 정도로 억제하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함한다. 특정 실시 태양에서, 상기 접촉은 시험관 내에서 이루어진다. 다른 특정 태양에서, 상기 접촉은 생체 내에서 이루어진다. 다른 특정 태양에서, 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 복수의 종양 세포와 함께 배양한 복수의 태반 줄기세포에서 얻는 것이다.

[0017]

여러 특정 실시 태양에서, 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 태반 줄기세포 대 종양 세포의 비율을 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1 또는 약 5:1로 하여 복수의 종양 세포와 공동 배양한 복수의 태반 줄기세포로부터 얻은 것이다. 이 방법에서는 종양 세포 증식 또는 종양의 성장을 검출할 수 있는 정도로 억제하기 위하여 필요하다면, 아무리 많은 수의 태반 줄기세포를 단독 배양하여, 혹은 복수의 종양 세포와 공동 배양하여 얻은 조건 배양 배지 또는 상충액이라도 사용할 수 있다. 예를 들어 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 약 1×10^5 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^6 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포 또는 이보다 많은 세포를 함유하는 배양물로부터 얻을 수 있다. 다른 특정 태양에서 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^5 개의 종양 세포, 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^6 개의 종양 세포, 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^7 개의 종양 세포 또는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^8 개의 종양 세포를 함유하는 공동 배양물로부터 얻을 수 있다.

[0018]

종양 세포 성장 또는 증식을 억제하는 본 발명 방법의 다른 특정 태양에서 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 단독으로 또는 종양 세포와 함께 배양한 다수의 태반 줄기세포를 포함하는 배양물로부터 얻은 배양 배지 또는 상충액인데, 여기서 상기 조건 배지를 생산할 세포의 수는 그 조건 배지를 투여받을 개체의 체중을 기준으로 정한다. 예를 들어 이 조건 배양 배지 또는 상충액은 개체의 체중 1 kg 당 대략 1×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^6 개의 태

반 줄기세포, kg 당 1×10^7 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 kg 당 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 함유하는 배양물로부터 생산한 조건 배지 또는 상층액이다. 다른 특정 태양에서, 상기 조건 배양 배지 또는 상층액은 kg 당 약 1×10^3 내지 약 5×10^3 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^3 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^4 내지 약 5×10^4 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^4 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^5 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^6 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^7 개의 종양 세포 또는 kg 당 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^8 개의 종양 세포를 함유하는 공동 배양물에서 얻은 배양 배지 또는 상층액이다.

[0019]

본 발명은 나아가 종양 세포 또는 종양 세포군의 증식이나 종양의 성장을 억제하는 능력 때문에 선별된 태반 줄기세포를 포함하는 세포군의 제조 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 선별하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하고, (b) CD200과 HLA-G를 발현, (또는 CD73, CD105와 CD200을 발현), (또는 CD200과 OCT-4를 발현), (또는 CD73, CD105와 HLA-G를 발현), (또는 CD73과 CD105를 발현하고 배아유사체(embryoid-like body)의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체의 형성을 촉진), (또는 OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 이 세포군에서 하나 이상의 배아유사체의 형성을 촉진하고, (c) 종양 세포, 복수의 종양 세포의 증식이나 종양의 성장을 검출할 수 있는 정도로 억제할 수 있다.

[0020]

본 발명은 또한 복수의 세포 속에서 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 HLA-G를 발현하고 (c) 종양 세포 증식을 검출 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 분리된 세포군의 생산 방법을 제공하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종(retinoblastoma) 또는 폐암종 세포들이다. 다른 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하고 (c) 종양 세포 증식을 검출 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 태양에서 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 OCT-4를 발현하고 (c) 종양 세포 증식을 검출 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 태양에서 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73과 CD105를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) 종양 세포 증식을 검출 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 실시 태양에서 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 HLA-G를 발현하고 (c) 종양 세포 증식을 검출 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 태양에서 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) 종양 세포 증식을 검출 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 상기 방법들의 더욱 구체적인 실시 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 주로 양막, 융모막, 양막과 융모막 또는 텃줄에서 유래한 것이다. 다른 더욱 구체적인 태양에서, 상기 방법에 쓰인 상기 줄기세포는 제대 줄기세포이다.

[0021]

분리된 태반 줄기세포군을 제조하는 상기 방법들 중 한 실시 태양에서 상기 방법은 중간엽 줄기세포에 특이적인 성질을 적어도 하나 나타내는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 더욱 특정한 실시 태양에서, 중간엽 줄기세포에 특이적인 상기 특성은 CD29의 발현, CD44의 발현, CD90의 발현 또는 이들을 조합하여 발현하는 특성이다. 본 발명 방법의 다른 특정 실시 태양에서 상기 선택은 항체를 이용하여 이루어진다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선택은 흐름세포 측정(Flow cytometry)을 통하여 이루어진다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선택은 자석비드(magnetic bead)를 이용하여 이루어진다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선택은 형광 표지 세포 분리(FACS)를 통하여 이루어진다. 상기 방법의 다른 특정 실시 태양에서 상기 세포군은 증폭(expansion)된다.

[0022]

본 발명은 또한 상기 모든 방법들에 따라 생산하거나 선별한 분리된 태반 줄기세포군을 제공한다. 예를 들어, 한 실시 태양에서 본 발명은 태반 줄기세포구를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포는 (a) 기질에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나 CD73, CD105와 CD200을 발현하거나 CD200과 OCT-4를 발현하거나 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나, 또는 OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하고, (c) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 것이다.

[0023]

어느 특정 실시 태양에서 상기 분리된 태반 세포군은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 HLA-G를 발현하고, (c) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 태반 줄기세포를 함유하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 특정 태양에서 상기 분리된 태반 세포군은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하고 (c) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 태반 줄기세포를 함유하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 특정 태양에서 상기 분리된 태반 세포군은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 OCT-4를 발현하고 (c) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 태반 줄기세포를 함유하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다.

[0024]

다른 특정 실시 태양에서 상기 분리된 태반 줄기세포군은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73과 CD105를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 태반 줄기세포를 함유하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 다른 특정 태양에서 상기 분리된 태반 줄기세포군은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 HLA-G를 발현하고 (c) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 태반 줄기세포를 함유하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다. 또 다른 특정 실시 태양에서 상기 분리된 태반 줄기세포군은 (a) 기질에 부착하면서 (b) OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) 태반 줄기세포와 접촉하지 않은 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능한 정도로 억제한다고 밝혀진 태반 줄기세포를 함유하는데, 여기서 상기 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 또는 폐암종 세포들이다.

[0025]

본 발명은 또한 앞서 설명한 모든 분리된 태반 줄기세포군 중 어느 것을 함유하는 조성물도 제공한다. 한 구체적 태양에서, 이 조성물은 또한 복수의 비태반 세포, 예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포 등의 중간엽 줄기세포와 같은 비태반성 줄기세포도 함유한다. 한 구체적 태양에서, 이 조성물은 또한 복수의 섬유모세포도 함유한다. 일부 실시 태양에서, 이 섬유모세포는 본 명세서에 기술하는 태반 줄기세포 조성물을 투여받을 대상의 자기 유래(autologous) 세포이다.

- [0026] 상기 방법들, 분리된 태반 줄기세포군과 조성물에서, 상기 태반 줄기세포를 추가적인 표지를 바탕으로 정의하거나, 선별할 수 있다. 예를 들어, CD200과 HLA-G를 발현하는 상기 태반 줄기세포는 또한 CD73과 CD105를 발현하는데, 즉 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 본 발명의 다른 특정 실시 태양에서, 상기 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 복수의 태반 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군으로부터 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다.
- [0027] 본 방법의 다른 더 구체적인 태양에서 CD73, CD105와 CD200을 발현하는 상기 태반 줄기세포는 또한 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 더욱 특정한 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻이고 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군으로부터 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다.
- [0028] 본 발명 방법의 다른 더 구체적인 실시 태양에서 있어서, CD200과 OCT-4를 발현하는 상기 태반 줄기세포는 또한 CD73과 CD105를 발현한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 더욱 특정한 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군으로부터 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다.
- [0029] 더 구체적인 다른 실시 태양에서 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하는 상기 태반 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 OCT-4⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD200⁺이다. 더욱 특정한 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺와 CD200⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군으로부터 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다.
- [0030] 더욱 특정한 다른 실시 태양에서 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는 상기 태반 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 OCT-4⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD200⁺이다. 다른 특정한 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 OCT-4⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다.
- [0031] 다른 더욱 특정한 실시 태양에서 OCT-4를 발현하는 상기 태반 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하고 또한 CD73⁺이면서 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD200⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻ 이면서 CD45⁻이다.
- [0032] 본 명세서에 기재된 상기 방법들, 분리된 세포군 및 조성물에 쓰이는 태반 줄기세포는 태반 전체 또는 그 모든 부분으로부터 유래할 수 있다. 예를 들어 다양한 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 주로 혹은 전적으로 양막, 아니면 양막과 용모막으로부터 유래한다. 다른 실시 태양에서, 본 발명의 방법에 쓰이는 줄기세포는 텃줄로부터 얻을 수 있다.

[0033]

본 발명은 나아가 종양 세포 억제성 태반 세포군을 선별하기 위하여 본 명세서에서 기술한 모든 상기 방법을 택하여 제조한 태반 줄기세포들을 함유하는 분리된 세포군을 제공한다. 예를 들어 한 실시 태양에서 본 발명은 분리된 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 제공하는데, 상기 태반 줄기세포는 (a) 기질에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나 CD73, CD105와 CD200을 발현하거나, CD200과 OCT-4를 발현하거나 또는 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 혹은 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나, 혹은 OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하며, (c) 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식이나 종양의 성장을 측정 가능하게 억제한다.

[0034]

본 발명은 나아가 냉동보존된 줄기세포군, 예를 들어 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 세포군은 본 명세서에서 기술하는 바와 같이 종양 세포 억제성이다. 예를 들어 본 발명은 $CD200^+$, $HLA-G^+$ 태반 줄기세포군을 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 본 발명은 또한 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 줄기세포를 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 본 발명은 또한 $CD200^+$, $OCT-4^+$ 태반 줄기세포군을 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 본 발명은 또한 $CD73^+$, $CD105^+$, $HLA-G^+$ 태반 줄기세포군을 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 본 발명은 또한 $OCT-4^+$ 태반 줄기세포군을 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 태반 세포군과 함께 배양되었을 때, 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는 것이다. 본 발명은 또한 $CD73^+$, $CD105^+$, $HLA-G^+$ 태반 줄기세포군을 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 본 발명은 또한 $OCT-4^+$ 태반 줄기세포군을 제공하는데, 이들은 태반 줄기세포와 접촉하지 못한 복수의 종양 세포와 비교하였을 때, 상기 복수의 종양 세포의 증식을 측정 가능하게 억제하며, 냉동보존되어 용기 속에 담겨 있는 것이다. 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 태반 세포군과 함께 배양되었을 때, 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하는 것이다.

[0035]

전술한 냉동 보존된 세포군에 관한 특정 실시 태양 중 어느 것에서건 상기 용기는 백(bag)일 수 있다. 많은 특정 실시 태양에서, 상기 세포군은 약, 적어도 또는 최대 1×10^6 개의 상기 줄기세포, 5×10^6 개의 상기 줄기세포, 1×10^7 개의 상기 줄기세포, 5×10^7 개의 상기 줄기세포, 1×10^8 개의 상기 줄기세포, 5×10^8 개의 상기 줄기세포, 1×10^9 개의 상기 줄기세포, 5×10^9 개의 상기 줄기세포 또는 1×10^{10} 개의 상기 줄기세포를 함유한다. 다른 실시 태양에서는 전술한 냉동보존 세포군 중 아무 것이나 선택하되, 그 줄기세포는 약 5회, 적어도 5회 또는 5회를 넘지 않도록 계대 배양한 것이고, 10회, 15회 또는 20회를 넘지 않도록 계대 배양한 것이다. 다른 구체적 실시 태양에서는 상기 냉동보존된 세포군 중 아무 것이나 선택하되, 그 줄기세포는 상기 용기 속에서 증폭된다.

[0036]

본 발명은 나아가 종양 세포 억제성 조성물, 즉 종양 세포 또는 종양 세포군의 증식이나 종양의 성장을 검출 가능한 정도로 억제하는 종양 세포 억제성 조성물을 제공한다. 예를 들어 한 실시 태양에서 본 발명은 이 명세서에 기재된 모든 분리된 태반 세포군 중 어떠한 것을 배양하여 얻은 상층액을 함유하는 조성물을 제공한다. 다른 실시 태양에서 본 발명은 분리된 태반 줄기세포를 배양하여 얻은 배양 배지를 함유하는 조성물을 제공하는데, 상기 태반 세포는 (a) 기질에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나 CD73, CD105와 CD200을 발현하거나, CD200과 OCT-4를 발현하거나 또는 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 혹은 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나, 혹은 OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하며, (c) 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식이나 종양의 성장을 측정 가능하게 억제하는데, 여기서 상기 배양된 태반 줄기세포는 상기 배지 속에 24시간 이상 배양된

것이다.

[0037] 다른 특정 실시 태양에서 상기의 모든 조성물은 매트릭스를 포함할 수 있다. 더 구체적인 실시 태양에서 상기 매트릭스는 3차원 골격(scaffold)이다. 다른 더 특정한 실시 태양에서 상기 매트릭스는 콜라겐, 젤라틴, 라미닌, 피브로네틴, 펙틴, 오르니틴 또는 비트로네틴을 함유한다. 다른 더욱 특정한 실시 태양에서, 상기 매트릭스는 양막 또는 양막 유래 생물질이다. 다른 더 구체적인 실시 태양에서 상기 매트릭스는 세포외 막단백질(extracellular membrane protein)을 함유한다. 다른 더 구체적인 실시 태양에서 상기 매트릭스는 합성 화합물을 함유한다. 다른 구체적인 실시 태양에서 상기 매트릭스는 생활성 화합물을 함유한다. 다른 더 구체적인 실시 태양에서 상기 생활성 화합물은 성장 인자, 사이토킨, 항체 또는 5,000 달톤 미만의 유기 물질이다.

[0038] 그리고 본 발명은 종양 억제와 관련된 재조합 또는 외래(exogenous) 사이토킨을 생산하도록 유전자 조작된 태반 줄기세포를 함유하는 약학 조성물을 제공한다. 예를 들어, 한 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 약학 조성물을 제공하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포는 외래 IFN- β 또는 IL-2를 발현한다. 한 특정 태양에서, 상기 종양 세포를 상기 태반 줄기세포와 접촉시켰을 때, 상기 태반 줄기세포는, 외래 IFN- β 또는 IL-2를 발현하지 않는 태반 줄기세포와 비교하여 검출 가능할 만큼, 종양 세포 증식을 더 많이 억제할 수 있는 분량으로 외래 IFN- β 또는 IL-2를 발현한다. 더욱 구체적인 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 (a) 기질에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나 CD73, CD105와 CD200을 발현하거나, CD200과 OCT-4를 발현하거나 또는 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 혹은 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나, 혹은 OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하며, (c) 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식이나 종양의 성장을 측정 가능하게 억제한다.

용어의 정의

[0040] 본 명세서에서 "약" 또는 "대략"이라는 것은, 예를 들어 언급한 값으로부터 $\pm 10\%$ 의 편차를 가리킨다.

[0041] 본 명세서에서 "SH2"라는 용어는 CD105 표지 분자 표면의 항원 결정기에 결합하는 항체를 일컫는다. 따라서 SH2⁺로 나타내는 세포는 CD105⁺이다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,486,359호를 보라.

[0042] 본 명세서에서 "SH3"과 "SH4"라는 용어는 CD73 표지 분자 표면의 항원 결정기에 결합하는 항체들을 일컫는다. 즉 SH3⁺ 및/또는 SH4⁺라고 나타낸 세포는 CD73⁺이다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,486,359호를 보라.

[0043] 본 명세서에서 "분리된 줄기세포"라는 용어는 상기 줄기세포가 유래한 조직, 예를 들어 태반의 다른 비줄기세포로부터 실질적으로 분리된 줄기세포를 말한다. 줄기세포는 그 줄기세포와 자연 상태에서 결부된 비줄기세포 중 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 예를 들어 상기 줄기세포의 수집 및/또는 세포 배양 과정에서 제거되었을 때 "분리된" 세포이다.

[0044] 본 명세서에서 "분리된 세포군(isolated population of cells)"이라는 용어는 상기 세포군이 유래한 조직, 예를 들어 태반의 다른 세포들로부터 실질적으로 분리된 세포군을 말한다. 세포군은 그 세포군 또는 그 세포군이 유래한 세포와 자연 상태에서 결부된 세포 중 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%를 예를 들어 상기 줄기세포군의 수집 및/또는 세포 배양 과정에서 제거하였을 때 "분리된" 세포군이다.

[0045] 본 명세서에서, "태반 줄기세포"라는 용어는 형상, 세포 표면 표지 또는 1차 배양 후 계대 수에 무관하게 포유류 태반에서 유래한 줄기세포 또는 전구세포로서 조직 배양 기질(tissue culture substrate), 예를 들어 조직 배양 플라스틱 또는 피브로네틴 피복 조직 배양판에 부착하는 것을 말한다. "태반 줄기세포"라는 용어는 양막, 융모막, 양막-융모막판 및/또는 텃줄을 포함하는 포유류 태반의 어느 일부에서 유래한 줄기세포 또는 전구세포와 태반 관류로부터 유래한 세포를 망라한다. 그러나 본 명세서에서 "태반 줄기세포"라는 용어는 영양막 세포(trophoblast) 또는 제대혈에서 얻은 세포를 가리키는 것은 아니다. 세포는 줄기세포의 특징 중 적어도 하나, 예를 들어 적어도 하나의 다른 세포 유형으로 분화할 수 있는 능력을 갖추고 있으면 "줄기세포"이다.

[0046] 본 명세서에서 줄기세포는 특정 표지를 검출할 수 있으면 그 표지에 대하여 "양성"이다. 이를 테면 태반 줄기세포는 예를 들어 CD73에 대하여 양성(즉 CD73⁺)인데, 이는 태반 줄기세포에서 CD73 신호가 배경 신호보다 측정 가능하게 더 큰 신호를 나타내기 때문(이를 테면 동종 세포 유형 대조군에 견주어)이다. 세포는 또한 어느 표지를 이용하여 그 세포를 적어도 하나의 다른 세포 유형과 구별할 수 있을 때 또는 그 표지가 세포 표면에 나타

나거나, 발현될 때 그 표지를 이용하여 그 세포를 선별 또는 분리할 수 있으면 그 표지에 대하여 양성이 된다.

[0047] 본 발명의 맥락에서 "종양 세포"는 비정상적 성장 유형을 나타내는 모든 세포를 뜻하는데, 양성(benign)이지만 과다형성(hyperplastic)인 세포, 암세포, 전이 암세포 등을 포함한다. "종양 세포"는 예를 들어 고형 종양 속의 한 세포 또는 고형 종양을 형성하려는 잠재성 또는 능력을 갖춘 세포, 또는 비고형인 종양의 세포, 예를 들어 혈액암 세포일 수 있다. 몇몇 태양에서, 이 종양 세포는 그 근원이 상피세포, 샘세포 또는 조혈세포이다. 몇몇 태양에서, 이 종양 세포는 조직구 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병, 급성 T-세포 백혈병, 급성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막 모세포종 세포 또는 폐암종 세포이다.

[0048] 본 명세서에서, "한 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식을 억제한다"는 것은 어느 대조군 또는 표준과 비교하였을 때 한 종양 세포 또는 복수의 종양 세포들의 증식 정도를 끌어내리는 것을 뜻한다. 예를 들어 복수의 태반 줄기세포의 존재 하에서 한 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식을 상기 태반 줄기세포의 부재하에 있는 같은 유형의 종양 세포 또는 복수의 종양 세포 증식과 비교하게 된다. 이 용어는 상기 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식을 검출 가능하게 줄이는 것, 증식의 중지 또는 종양 세포수의 감소를 망라한다.

1. 태반 줄기세포를 이용한 종양 억제

[0049] 본 발명은 태반 줄기세포를 이용한 종양 세포 증식의 억제와 종양 성장의 억제 방법을 제공한다. 한 실시 태양에서, 본 발명은 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식이나 종양의 성장 또는 비고형인 종양 세포나 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 세포 또는 세포들 또는 종양을 복수의 태반 줄기세포와 접촉시키는 단계를 포함하되, 여기서 상기 접촉은 상기 태반 줄기세포가 상기 종양 세포 또는 세포들의 증식 또는 종양의 성장을 검출 가능한 정도로 억제하기에 충분한 시간 동안 이루어진다.

[0050] 태반 줄기세포는 예를 들어 본 명세서의 다른 곳에서 기술하는 태반 줄기세포(발명의 상세한 설명 단락 2를 참조)이다. 종양 세포 억제를 위한 태반 줄기세포는 하나의 태반 또는 복수의 태반에서 유래하거나 얻을 수 있다. 종양 세포 억제에 쓰이는 태반 줄기세포는 하나의 종, 예를 들어 줄기세포를 수혈받을 대상이 속하는 종 또는 기능을 저하시키거나 억제하여야 할 종양 세포가 속하는 종에서 유래하거나 여러 종으로부터 유래할 수 있다. 태반 줄기세포는 태반 전체로부터 얻거나, 태반의 어느 일부분, 예를 들어 양막, 융모막, 양막-융모막판 또는 제대로부터 얻을 수 있다. 태반의 어떠한 일부분에서 유래한 태반 줄기세포라도 본 발명의 방법에 쓰일 수 있다. 태반 줄기세포는 이 분야에 알려진 모든 방법, 예를 들어 관류나 효소 소화를 이용하여 태반 또는 그 일부분으로부터 수집할 수 있다.

[0051] 종양 세포는 신생물(新生物)성(neoplastic) 세포 성장과 증식을 나타내는 모든 세포일 수 있는데, 악성과 양성을 가리지 않으며, 전암(前癌) 상태인 세포와 암세포를 망라한다. 종양 세포의 예로는 암종 세포, 림프종 세포, 모세포종 세포, 육종 세포와 백혈병 세포를 들 수 있지만 이들로 한정되지는 않는다. 종양 세포의 더 구체적인 예로는 유방암 세포, 전립선암 세포, 대장암 세포, 편평 상피세포암 세포, 소세포(小細胞) 암세포, 비(非)소세포 폐암세포, 소화관의 암세포, 췌장암 세포, 아교모세포종, 자궁경부암 세포, 난소암 세포, 간암 세포, 방광암 세포, 간암(hepatoma) 세포, 직장결장암 세포, 자궁내막 암종 세포, 침샘 암종 세포, 신장암 세포, 간암 세포, 음문(陰門 vulva) 암세포, 갑상선암 세포, 간암종(hepatic carcinoma) 세포와 여러 가지 두경부암 세포가 있다. 특정 실시 태양에서, 이 종양 세포는 거핵모세포(megakaryoblast) 림프종 세포, 급성 림프모세포(lymphoblast) 백혈병 세포, 급성 T-세포 백혈병 세포, 조직구 림프종 세포, 골수의 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 대장 선암종 세포, 망막모세포종 세포와 폐암종 세포이다.

[0052] 한 개체 속에 있는 종양 세포는 암 상태로 의심되는 조직의 생검을 하거나, 체액 시료, 예를 들어 혈액 시료로부터 분리 또는 정제한 세포를 분석하여 결정할 수 있다. 그리고 나서 암 상태인 세포 또는 조직의 특성을 다양한 생물학적, 분자적, 형태학적, 세포학적 수단으로 파악할 수 있다. 구체적으로 생물학적 표지와 분자 표지는 (상피세포 등의) 세포원의 종류, (유방 또는 전립선과 같은 장기의 종류) 구체적인 세포 종류, 세포 성장 또는 세포 성장 잠재력, 세포 성장 정지, 과다 배수성(hyperploidy) 여부 등의 특성을 평가하는데 쓸 수 있다. 이러한 세포 표지는 단독 또는 조합하여 쓰이는 분자적, 생화학적, 생물학적 표지와 탐지자(probe) 중에서 고를 수 있다.

[0053] 본 명세서의 맥락에서 "접촉"이란 태반 줄기세포와 종양 세포를 시험관 내에서 함께 모으는 것, 이를테면 한 용기(예를 들어 배양 접시, 플라스크, 비알 등)에 모으는 것을 말한다. "접촉"은 또한 태반 줄기세포와 종양 세포를 생체 내에 함께 모으는 것, 예를 들어 동일한 개체(예를 들어 마우스, 래트, 개, 고양이, 양, 염소, 말,

사람 등의 포유류) 속에서 모으는 것, 이를 테면 그 개체에 태반 줄기세포를 정맥 투여로 제공하거나 종양의 자리에 직접 주사하거나 하는 등의 방법도 망라한다. 생체 내 접촉의 어떠한 실시 태양에서, 상기 태반 줄기세포와 상기 종양 세포는 배양되는 세포이다. 다른 일부 태양에서, 상기 세포는 동일한 물리적 공간 속에서 배양되는데, 예를 들어 같은 배양 접시 또는 한 배양 접시 속 같은 웰이다. 다른 태양에서, 상기 접촉은 상기 태반 줄기세포와 상기 종양 세포 사이에 직접적인 물리적 접촉을 요하지 않는다. 예를 들어, 상기 접촉은 상기 태반 줄기세포와 상기 종양 세포를 별도의 물리적 공간, 예를 들어 한 세포 배양 접시 속의 다른 웰 속에서 배양하는 단계를 포함할 수 있는데, 여기서는 상기 태반 줄기세포와 상기 종양 세포가 양 세포를 담고 있는 배양 배지를 공유한다. 생체 내 접촉의 몇몇 태양에서는, 상기 태반 줄기세포와 종양 세포 모두가 상기 개체에 관해서 외래(exogenous) 세포인데, 즉 양 세포 모두 이 개체에서 유래한 것이 아니다. 다른 태양에서, 상기 종양 세포는 종양 생성 과정을 통하여 상기 개체 속에서 생겨난 종양 세포, 즉 그 개체에 내재적인(endogenous) 세포이다. 바람직한 실시 태양에서 이러한 (시험관 내 또는 생체 내) 접촉은 상기 종양 세포 또는 종양 세포들의 증식을 상기 접촉 후 어느 정도의 기간 동안 검출 가능한 정도로 억제하는데 충분한 수의 태반 줄기세포를 충분한 시간 동안 사용하여 이루어진다. 더 바람직스럽게는, 여러 실시 태양에서 상기 접촉은 상기 태반 줄기세포의 부재하에 있는 종양 세포의 증식과 비교했을 때, 종양 세포 또는 세포들의 증식을 상기 접촉 후 어느 정도의 기간 동안 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제하는데 충분한 것이다. 더더욱 바람직스럽게는, 상기 종양 세포 또는 복수의 종양 세포의 증식이 완전하게 억제되는데, 이 억제된 상태에서 상기 종양 세포는 상기 접촉 후 어느 정도의 기간 동안 증식하지 않거나, 종양 세포 총수를 늘리기에 충분할 만큼 증식하지 못한다. 여러 실시 태양에서, 상기 어느 정도의 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일이거나, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10주 또는 그 이상이다.

[0055]

종양 세포, 예를 들어 한 개체 속 종양 세포를 억제하는 데에는 종양 세포의 증식이나 종양의 성장을 검출 가능한 정도로 억제하는 효과를 내는데 필요한 아무리 많은 수의 태반 줄기세포라도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 방법의 여러 실시 태양에서, 복수의 태반 줄기세포를 복수의 종양 세포, 예를 들어 한 개체의 종양 세포에 접촉시키게 되는데, 여기서 상기 복수의 태반 줄기세포는 약 1×10^5 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^6 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^7 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^9 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^{10} 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^{11} 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^{12} 개의 태반 줄기세포 혹은 그 이상을 함유한다.

[0056]

다른 실시 태양에서, 본 발명의 방법은 상기 개체의 체중 1 kg 당 적어도 약 1×10^5 , 적어도 약 1×10^6 , 적어도 약 1×10^7 , 또는 적어도 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 태양에서는 약 1백만 개의 태반 줄기세포를 복수의 종양 세포를 가지는 한 개체의 체중 1 kg마다 투여한다.

[0057]

여러 특정 태양에서, 본 방법은 한 개체 속 종양 세포 수의 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배 분량 또는 5배를 넘는 분량의 태반 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다. 개체 속 종양 세포의 수를 측정하기 이 분야에서 알려진 모든 방법을 사용할 수 있다. 종양 세포 정량을 위한 예시 방법은 미국 특허 제6,365,362호와 6,645,731호, Mehes 외, *Haematologia* 31(2):97~109(2001)와 Hardingham 외, *Cancer Research* 53:3455~3458(1993)에서 기재하고 있는데, 이들 문헌의 내용 전부는 본 명세서의 참고 문헌이다. 더 구체적인 수많은 실시 태양에서 본 발명의 방법은 개체 체중을 기준으로 하여 다수의 태반 줄기세포를 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어 이 방법은 대략 kg 당 1×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^7 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 kg 당 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 많은 더 구체적인 실시 태양에서, 본 방법은 상기 개체에 kg 당 적어도 약 1×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 1×10^7 개의 태반 줄기세포, kg 당 적어도 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 kg 당 적어도 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포를

투여하는 단계를 포함한다.

[0058] 더 구체적인 여러 실시 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 시험관 내에서 세포 수 배증한 횟수가 30회를 넘지 않는 세포, 20회를 넘지 않는 세포, 10회를 넘지 않는 세포 또는 5회를 넘지 않은 세포이다. 다른 특정 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 냉동 보존되고 상기 접촉 전에 해동된다. 본 방법의 다른 특정 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 상기 종양 세포 증식을, 상기 태반 줄기세포의 부재하에서 같은 수의 종양 세포가 증식하는 경우와 비교하였을 때, 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제한다.

[0059] 더 유리하게는, 상기 태반 줄기세포, 예를 들어 어느 개체 또는 개체 집단, 어느 생체 조직 등에서 얻은 태반 줄기세포를 사용하기 전에 이들이 종양 억제 활성을, 즉 어느 개체 속에서 종양 세포의 성장이나 증식을 억제하는 활성을 지니는가에 따라 세포를 선별한다. 따라서 어느 실시 태양에서, 태반 줄기세포를 이용한 종양 세포의 증식 또는 성장 억제 방법은 상기 개체에 대하여 상기 태반 줄기세포를 투여하기 전에 시험관 내에서 세포들을 선별하는 단계를 포함하는데, 여기서는 종양 세포 성장 억제 활성을 가지느냐에 따라 선별하게 된다. 본 방법의 더 구체적인 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 상기 태반 줄기세포의 부재하에서 같은 수의 종양 세포가 증식하는 경우와 비교하였을 때, 시험관 내에서 종양 세포 증식을 예를 들어, 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제한다고 상기 개체에 투여하기 전에 확인된 세포인데, 여기서 이 증식은 소정의 기간 동안 동일한 조건에서 생성한 세포의 수를 척도로 삼는다. 태반 줄기세포는 직접 접촉 또는 가용성 인자(soluble factor)를 통한 방식, 또는 양쪽 모두를 통하여 종양 세포를 억제할 수 있다. 따라서 본 방법의 더 구체적인 다른 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 직접 배양 분석, 트랜스웰(transwell) 분석 또는 더 바람직하게, 직접 배양 분석과 트랜스웰 분석 양쪽에서 시험관 내 종양 세포 증식을 억제한다고 상기 개체에 투여하기 전에 확인된 세포이다.

[0060] 태반 줄기세포가 종양 세포 증식이나 성장 억제 효과를 가지는지 선별하는 데에는 어떠한 종양 세포라도 쓸 수 있지만, 더 유용한 선별은 발명한 환자 속의 종양 억제 조건을 복제하거나, 복제하려고 시도하는 것들이다. 이를 테면, 다른 특정 실시 태양에서는, 본 발명에 따라 상기 태반 줄기세포를 투여받을 개체 속의 종양 세포와 동일한 종양 세포, 예를 들어 편평 상피세포 등의 동일한 세포 유형, 예를 들어 가슴, 전립선 등의 동일한 조직, 또는 더 바람직하게는, 세포 유형과 조직이 모두 동일한 곳에서 유래한 종양 세포를 대상으로, 상기 태반 줄기세포가 종양 세포의 증식 또는 종양 성장을 시험관 내에서 억제할 수 있는지에 대해서 선별한다. 다른 더 구체적인 태양에서는 상기 개체의 생검에서 얻은 종양 세포 또는 상기 개체의 혈액 시료에서 분리 또는 정제한 종양 세포를 상대로, 시험관내 종양 성장 억제능을 지니는 세포를 상기 태반 줄기세포 중에서 선별한다.

[0061] 본 방법의 더 구체적인 태양 중 여러 경우에서는 상기 태반 줄기세포가 양막, 응모막, 양막-응모막(amnion-chorion), 탯줄 또는 태반 관류액에서 유래한 세포이고, 상기 줄기세포의 부재하에 있는 같은 수의 종양 세포의 증식과 비교하였을 때, 시험관 내에서 종양 세포 증식을 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95% 억제하는 것으로 상기 개체에 투여하기 전에 확인된 세포들이다.

[0062] 생체 내에서 상기 태반 줄기세포와 내재적인(endogenous) 종양 세포, 예를 들어 고령인 종양 또는 혈액암을 접촉시키기는데는, 살아 있는 세포를 한 개체에 도입하는데 유효하다고 이 분야에 알려진 모든 방법을 사용하여 상기 태반 줄기세포를 상기 개체 속으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 상기 태반 줄기세포는 정맥 수혈, 근육 투여, 복강 투여 또는 피하 투여 등의 방식으로 개체에 투여될 수 있다. 바람직한 태양에서, 상기 태반 줄기세포는 상기 개체 속 종양 또는 종양 세포 자리 또는 그 부근에 투여된다. 태반 줄기세포를 포획하고 있고, 이식 후에는 그로부터 세포가 자라날 수 있는 기구, 예를 들어 천연 또는 인공 매트릭스나 젤라틴을 이식함으로써 세포를 도입할 수도 있다. 이러한 매트릭스의 비제한적인 예는 아래 상세한 설명의 6.1.4. 단원에 나와 있다.

[0063] 이러한 태반 줄기세포를 앞서 설명한 어느 방법 또는 당업자에게 알려진 다른 방법을 써서 개체에 도입하면 상기 태반 줄기세포와 종양 세포의 접촉을 촉진하는데 충분하다. 태반 줄기세포를 어느 개체, 특히 내재적인 종양 세포를 가지고 있는 개체에 투여하는 것은 1회의 세포 도입 또는 몇 시간, 며칠, 몇 주, 몇 달이나 몇 년에 걸친 여러 번의 세포 도입을 포함할 수 있다. 매희의 태반 줄기세포 도입량은 복수의 종양 세포 증식을 검출 가능한 정도로 억제하기에 그 자체로 충분한 수량의 줄기세포를 포함하거나 전체 총량으로 억제하기에 충분한 분량을 포함할 수 있다. 생체내 투여를 위하여 태반 줄기세포를 약학 조성물로 조제할 수 있는데, 이는 아래 6.1. 단원에 기재되어 있다.

[0064] 생체 내 맥락에서의 억제도는 시험관 내 분석으로 측정할 수 있는데, 예를 들어, 어떤 기간 동안 최적 성장 조건하에 있는 종양 세포 또는 복수의 종양 세포가 생성하는 종양 세포의 수를 같은 시간 동안 태반 줄기세포와 접촉 중인 같은 수의 종양 세포가 생산하는 종양 세포 수와 비교함으로써 할 수 있다. 종양 세포를 비롯한 세

포의 증식은 공기 기술에 알려진 모든 방법을 이용하여 평가할 수 있다. 예를 들어 배양물 또는 개체 속의 세포를 여러 시점에서 채집한 다음 혈구계나 비슷한 장치를 사용하여 세포 수를 셀 수 있다. 이 종양 세포를 딸 세포에로 분화되는 비파괴성 염료를 이용하여 염색할 수 있는데, 예를 들어 브로모디옥시유리딘(BrdU), 이아세트산 카르복시플루오레사인(carboxyfluorescein diacetate, CFSE) 또는 오레곤 그린 488 카르복시산 이아세트산화물(diacetate)(Invitrogen사)이 있으며, 염색 정도는 세포 측정 장치로 측정할 수 있다. 태반 줄기세포가 종양 세포 성장을 억제하는 곳은 태반 줄기세포와 접촉 중인 종양 세포에서 태반 줄기세포와 접촉하지 않는 종양 세포보다 세포 당 염색 정도가 측정 가능한 정도로 더 낮은 곳(예를 들어 세포 당 평균 염색량이 측정 가능한 정도로 낮은 곳)이다. 어느 정해진 수의 태반 줄기세포와 종양 세포에 관한 시험관 내 분석에서의 억제 정도를 한 개체 속 종양 또는 종양 세포의 억제 정도로 외삽할 수 있다.

[0065] 종양 성장의 억제는 생체 내 종양을 영상화하거나 검출하는 것으로 이 분야에 알려진 모든 방법을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 종양 세포를 종양 특이적 항체로 표지하고 PET 주사 또는 CAT 주사법 혹은 X선 등을 이용하여 영상화할 수 있다. 종양 성장의 억제 여부 판별은 예를 들어 종양 영상의 육안 감식, 종양의 표지 세기 측정, 종양의 영상에서 종양 면적의 측정 등을 통하여 확인할 수 있다. 생체 내 종양 성장의 억제를 측정하는 것은 그 종양과 관련된 증상의 제거, 개선 또는 증상 악화의 감소를 진단하거나 주목함으로써 이루어질 수 있다.

[0066] 상기 개체는 포유류, 예를 들어 사람일 수 있다. 다른 더 구체적인 태양에서 상기 접촉은 상기 태반 줄기세포를 상기 개체에 정맥하 투여하는 단계를 포함한다. 더 구체적인 다른 태양에서, 상기 접촉은 상기 태반 세포를 상기 개체 속 종양의 자리 또는 그 부근에 투여하는 단계를 포함한다.

[0067] 태반 줄기세포를 하나 이상의 다른 세포 유형의 줄기세포, 예를 들어, 콜수 유래의 중간엽 줄기세포와 함께 투여할 수 있다. 이러한 다른 줄기세포를 한 개체에 대하여 예를 들어 약 1:10 내지 약 10:1의 비율로 태반 줄기세포와 함께 투여할 수 있다.

[0068] 태반 줄기세포를 줄기세포가 아닌, 한 가지 이상의 세포와 함께 투여할 수 있다. 한 특정 태양에서는, 이 태반 줄기세포를 어느 개체에서 자기 유래(autologous)한 두 번째 종류의 세포들과 함께 그 개체에 투여할 수 있다. 더 구체적인 태양에서는, 상기 태반 줄기세포를 섬유모세포와 공동 투여한다. 몇몇 태양에서, 이 섬유모세포는 자기 유래 섬유모세포이다. 이 섬유모세포를 한 개체에 대하여 예를 들어, 약 1:10 내지 약 10:1의 비율로 태반 줄기세포와 함께 투여할 수 있다.

[0069] 상기 태반 줄기세포를 하나 이상의 줄기세포 화학 유인 물질(chemoattractant)과 함께 투여할 수 있다. 한 특정 태양에서, 이 줄기세포 화학 유인 물질은 SDF-1이다.

2. 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군

[0070] 본 발명의 종양 세포 증식 억제 방법은 태반 줄기세포를 이용한다. 즉 태반 혹은 그 일부로부터 얻을 수 있는 줄기세포로서 (1) 조직 배양 기질에 부착하고, (2) 비태반 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖추고 있으며, (3) 충분한 수일 때, 종양 세포 또는 복수의 종양 세포 증식이나 종양의 성장을 검출 가능한 정도로 억제하는 능력을 가지는 줄기세포이다. 태반 줄기세포는 태반 혈액 또는 제대혈 등의 혈액에서 유래하지 않는다. 본 발명의 방법과 조성물에서 쓰이는 태반 줄기세포는 암세포 또는 복수의 암세포의 증식을 생체 내 또는 시험관 내에서 억제하거나 종양의 생체 내 성장을 억제하는 능력을 갖추고 있으며, 이러한 능력을 가지는 세포가 선택된다.

[0072] 태반 줄기세포는 태아 또는 모체에서 유래한 것(즉 태아 아니면 모체의 유전형을 떨 수 있음)이다. 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포를 함유하는 세포군은 오로지 태아 유래 또는 오로지 모체 유래인 태반 줄기세포를 포함할 수 있고, 또 태아와 모체 유래가 섞인 혼합 태반 줄기세포군을 포함할 수도 있다. 상기 태반 줄기세포와 상기 태반 줄기세포를 함유하는 세포군은 아래에 기술하는 형태학적 표지와 배양 특성에 따라 동정되고 선택될 수 있다.

2.1 물리적 · 형태학적 특성

[0074] 본 발명에서 사용되는 태반 줄기세포는 1차 배양되거나 세포 배양되었을 때 조직 배양 기질, 예를 들어 조직 배양 용기의 표면(조직 배양용 플라스틱 등)에 부착한다. 배양 중인 태반 줄기세포는 일반적으로 섬유모세포 형상이며 별 모양이고 세포체의 중심에서 세포질 돌기가 몇 군데 불거져 나온다. 이 태반 줄기세포는 그러나 같은 조건하에서 배양된 섬유 모세포와 형태학적으로 구별이 가능한데, 태반 줄기세포는 섬유모세포보다 그러한 돌기를 더 많이 나타내기 때문이다. 형태학적으로 태반 줄기세포는 조혈 줄기세포와도 구별할 수 있는데, 조혈

줄기세포는 배양시 더 둉글거나 조약돌 모양을 나타낸다.

2.2 세포 표면, 분자 표지와 유전적 표지

[0075] 본 발명의 방법과 조성물에 유용한 태반 줄기세포와 태반 줄기세포군은 상기 줄기세포 또는 이 줄기세포를 함유하는 세포군의 동정 및/또는 분리에 쓰일 수 있는 표지를 여러 개 발현한다. 본 발명의 태반 줄기세포와 줄기세포군(즉 둘 이상의 태반 줄기세포)은 태반으로부터 직접 얻거나 태반의 어느 일부분(예를 들어 양막, 용모막, 태반의 태반엽, 텃줄 등)에서 얻은 줄기세포와 줄기세포 함유 세포군을 포함한다. 태반 줄기세포군은 또한 배양 중인 태반 줄기세포와 백과 같은 용기 안에 든 세포의 군(즉 둘 이상의 태반 줄기세포)을 포함한다. 태반 줄기세포는 하지만 영양막 세포가 아니다.

[0077] 태반 줄기세포는 일반적으로 CD73, CD105, CD200, HLA-G 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38 또는 CD45를 발현하지 않는다. 태반 줄기세포는 또한 HLA-ABC(MHC-1)와 HLA-DR을 발현한다. 이들 표지는 태반 줄기세포를 동정하고 태반 줄기세포를 다른 줄기세포로부터 구별하는데 쓰인다. 상기 태반 줄기세포가 CD73과 CD105를 발현할 수 있기 때문에, 이들은 중간엽 줄기세포와 유사한 특성을 지닐 수 있다. 그러나 이 태반 줄기세포는 태아 특이적 표지인 CD200과 HLA-G를 발현할 수 있기 때문에 중간엽 줄기세포, 예를 들어 골수 유래 중간엽 줄기세포와 같이 CD200과 HLA-G를 발현하지 않는 것들과는 구별할 수 있다. 마찬가지 방식으로 CD34, CD38 및/또는 CD45의 미발현으로부터 이 태반 줄기세포가 비조혈 줄기세포임을 알 수 있다.

[0078] 한 실시 태양에서 본 발명은 $CD200^+$, $HLA-G^+$ 인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 상기 복수의 태반 줄기세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 정도로 억제한다. 분리된 세포군에 관한 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 또한 $CD73^+$ 이고 $CD105^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 이고 $CD105^+$ 이다. 다른 실시 태양에서 상기 분리된 세포군은 배아유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때, 하나 이상의 배아유사체를 발생한다.

[0079] 본 발명 방법의 다른 실시 태양에서는 $CD73^+$, $CD105^+$ 와 $CD200^+$ 인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 상기 복수의 줄기세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 정도로 억제한다. 상기 세포군의 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 또한 $HLA-G^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 이고 $CD45^-$ 이다. 또 다른 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$ 이고 $HLA-G^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 세포군은 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성한다.

[0080] 본 발명은 또한 $CD200^+$ 이고 $OCT-4^+$ 인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 줄기세포는 암세포의 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 정도로 억제한다. 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 $CD73^+$ 이고 $CD105^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $HLA-G^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 이고 $CD45^-$ 이다. 다른 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ 이고 $HLA-G^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 세포군은 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성한다.

[0081] 본 발명은 또한 $CD73^+$, $CD105^+$ 이고 $HLA-G^+$ 인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 줄기세포는 MLR에서 T 세포의 증식을 측정 가능한 정도로 억제한다. 특정 실시 태양에서, 상기 복수의 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 이고 $CD45^-$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 $OCT-4^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 $CD200^+$ 이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT-4^+$ 이고 $CD200^+$ 이다.

[0082] 본 발명은 또한 $CD73^+$, $CD105^+$ 인 복수의 종양 세포 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성하고, 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 정도로 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 줄

기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 OCT-4⁺이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다.

[0083] 본 발명은 또한 OCT-4⁺인 복수의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공하는데, 여기서 상기 복수의 줄기세포는 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 배양하였을 때, 하나 이상의 배아유사체를 형성하고, 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 정도로 억제한다.

[0084] 다양한 실시 태양에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 상기 분리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 줄기세포이다. 상기 세포군의 특정 실시 태양에서, 상기 줄기세포는 CD73⁺이고 CD105⁺이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD200⁺이다. 더 특정한 실시 태양에서 상기 줄기세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻이다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 세포군은 증폭된 것, 예를 들어 적어도 한 차례, 적어도 세 차례, 절도 다섯 차례, 적어도 열 차례, 절어도 열다섯 차례 또는 적어도 스무 차례 계대(passage)된 것이다.

[0085] 상기 실시 태양 중 어느 것에서건, 본 발명 방법은 ABC-p(태반 특이적 ABC-전달 단백질, 예를 들어, Allikmets 외, *Cancer Res.* 58(23):5337~5339(1998)을 보라)를 발현하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계를 더 포함한다. 이 방법은 또한 예를 들어 중간엽 줄기세포에 특이적인 특징을 적어도 하나 나타내는 세포를 선택하는 단계를 포함할 수도 있는데, 이를 테면, CD29의 발현, CD44의 발현, CD90의 발현 또는 이들의 조합 발현이 있다.

[0086] 다른 실시 태양에서 본 발명은 CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻이고 CD133⁻인 복수의 종양 세포 억제성 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 세포군을 제공한다.

[0087] 상술한 태반 줄기세포의 한 구체적 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 IL-6, IL-8과 단핵구 세포 유인 화학물질(chemoattractant) 단백질(MCP-1)을 구성적으로(consitutively) 분비한다.

[0088] 각각의 상기 언급한 복수의 태반 줄기세포는 포유류 태반에서 직접 분리하여 얻은 태반 줄기세포 또는 배양되고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 또는 그 이상 계대되고 배양된 태반 줄기세포 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0089] 상술한 복수의 종양 세포 억제성 태반 줄기세포는 적어도 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 이보다 많은 수의 태반 줄기세포를 함유하거나, 적어도 이 정도의 줄기세포를 함유하거나, 혹은 이 정도 수 이하의 줄기세포를 함유한다.

2.3 태반 줄기세포군의 선별과 제조

[0091] 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 세포군의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 줄기세포인 태반 세포군을 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 CD73⁺이면서 CD105⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성하는 복수의 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

[0092] 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상

기 선별 단계는 HLA-G⁺ 인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻이고 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성하는 태반 세포군을 선별하는 것을 더 포함한다.

[0093] 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD200⁺, OCT-4⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 CD73⁺, CD105⁺이기도 한 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺이고 HLA-G⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

[0094] 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 태반 줄기세포는 T 세포 증식을 MLR 분석에서 측정 가능하게 억제한다. 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD200⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺이고 CD200⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

[0095] 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 CD73⁺, CD105⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 태반 세포는 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성하며, 상기 줄기세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 검출 가능한 정도로 억제한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 OCT-4⁺인 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

[0096] 다른 실시 태양에서 본 발명은 복수의 태반 줄기세포를 복수의 태반 세포로부터 선별하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%가 OCT-4⁺인 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 태반 세포는 배아유사체 형성을 허용하는 조건하에서 배양하였을 때 하나 이상의 배아유사체를 형성하면서, 암세포 증식 또는 종양 성장을 검출 가능한 정도로 억제한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 선별 단계는 또한 CD73⁺이고 CD105⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 또한 CD200⁺인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서, 상기 선별 단계는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻인 태반 줄기세포를 선별하는 것을 포함한다.

- [0097] 본 발명은 또한 종양 세포 증식을 억제할 수 있는 태반 줄기 세포군을 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 앞서 설명한 복수의 태반 줄기세포 중 아무 것이라도 선별하는 단계, 상기 복수의 태반 줄기세포를 다른 세포, 예를 들어 다른 태반 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다. 특정 실시 태양에서, 본 발명은 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 세포를 선별하는 단계를 포함하는데, 여기서 상기 태반 세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나, CD73, CD105와 CD200을 발현하거나, CD200과 OCT-4를 발현하거나 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 혹은 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나,
- [0098] OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하며, (c) 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 수준으로 억제한다. 이 방법은 또한 상기 태반 줄기세포를 다른 세포로부터 분리하여 세포군을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0099] 더 구체적인 실시 태양에서 본 발명은 세포군의 제조 방법을 제공하는데, 이 방법은 태반 줄기세포를 선별하는 단계를 포함하고, 이때 이 태반 줄기세포는 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 HLA-G를 발현하고 (c) 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 수준으로 억제한다. 이 방법은 또한 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함한다. 다른 구체적 실시 태양에서 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 CD200을 발현하고 (c) 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD200과 OCT-4를 발현하고 (c) 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73과 CD105를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 다른 특정 실시 태양에서, 본 발명은 (a) 기질에 부착하면서 (b) CD73, CD105와 HLA-G를 발현하고 (c) CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 증식을 MLR 분석법에서 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 (a) 기질에 부착하면서 (b) OCT-4를 발현하고, (c) 배아유사체 형성이 가능한 조건하에서 배양되었을 때 배아유사체를 형성하며 (d) 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 수준으로 억제하는 태반 줄기세포를 선택하는 단계와 상기 태반 줄기세포를 나머지 세포로부터 분리하여 세포군(cell population)을 형성하는 단계를 포함하는 세포군의 형성 방법을 제공한다.
- [0100] 태반 줄기세포군을 선별하는 상기 방법에서는, 상기 선별 단계가 상기 태반 줄기세포 시료가 암세포 증식 또는 종양 성장을 억제하는지 판별하는 단계와 상기 태반 줄기세포 시료가 암세포 증식 또는 종양 성장을 측정 가능한 정도로 억제하는 경우 그 태반 줄기세포군을 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0101] 2.4 세포 배양하의 성장
- [0102] 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포의 성장은, 모든 포유류 세포와 마찬가지로 세포 성장용으로 선택한 특정 배지에 부분적으로 달려있다. 최적 조건 하에서 태반 줄기세포는 3~5 일만에 배증하는 것이 전형적이다. 세포 배양 중에 본 발명에 따른 상기 태반 줄기세포는 배양 기질, 예를 들어 조직 배양 용기의 표면(조직 배양 접시 플라스틱, 피브로넥틴 피복 플라스틱 등)에 부착하여 단일 세포층을 이룬다.
- [0103] 본 발명의 태반 줄기세포를 함유하는 분리된 태반 세포군은 적절한 조건 하에서 배양되었을 때 배아유사체(embryoid-like body), 즉 상기 부착 줄기세포층 위로 세포가 자란 3차원적 덩어리를 형성한다. 상기 배아유사체 내부의 세포는 아주 초기의 줄기세포와 연관된 표지, 예를 들어 OCT-4, Nanog, SSEA3와 SSEA4를 발현한다. 상기 배아유사체 내부의 세포는 배양 기질에 부착하지 않는 것이 전형적인 경우이고, 이는 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포도 마찬가지이지만, 배양 도중에서는 부착 세포에 달라붙은 채로 있다. 배아유사체 세포는 생존을 위하여 부착 태반 줄기세포에 의존하는데, 배아유사체는 부착 줄기세포의 부재하에서는 형성되지 않는다. 상기 부착 태반 줄기세포는 따라서 부착 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군 속에서 하나 또는 그

이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진한다. 어떤 이론에 구애받고자 하는 것은 아니지만, 이 배아유사체 세포는 배아 줄기세포가 피더(feeder) 세포층 위에 자라는 것처럼 부착 태반 줄기세포 위에서 성장하는 것으로 생각된다. 골수 유래 중간엽 줄기세포 등의 중간엽 줄기세포는 배양시 배아유사체를 형성하지 않는다.

[0104] 3. 태반 줄기세포를 얻는 방법

[0105] 3.1 줄기세포 수집용 조성액

[0106] 본 발명은 나아가 태반 줄기세포를 수집하고 분리하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 줄기세포는 생리학적으로 적합한 용액, 예를 들어 줄기세포 수집용 조성액(stem cell collection composition)을 이용하여 포유류 태반으로부터 얻게 된다. 줄기세포 수집용 조성액은 2005년 12월 29일자 관련 미국 예비 출원 제60/754,969호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 자세하게 기재되어 있다.

[0107] 줄기세포 수집용 조성액은 줄기세포의 수집 및/또는 배양에 적당한 모든 생리학적으로 적합한 용액을 함유할 수 있는데, 여기에는 식염수(예를 들어 인산염 완충 식염수, Kreb 용액, 변형 Kreb 용액, Eagle 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지(DMEM, H.DMEM 등) 등이 있다.

[0108] 줄기세포 수집용 조성액은 태반 줄기세포를 보존하는 성질이 있는 성분을 하나 이상 갖추고 있는데, 보존이란 즉 수집으로부터 시작하여 배양시까지 태반 줄기세포의 사멸을 막거나, 사멸을 지연하거나, 세포군 속에서 사멸하는 태반 줄기세포의 수를 줄이거나 하는 등의 특성이다. 이러한 성분으로는 세포자멸사 억제제(예를 들어 카스파제(caspase) 억제제, JNK 억제제), 혈관 확장제(vasodilator, 예를 들어 황산마그네슘, 혈압 강하제, 심방나트륨 이뇨 펩티드(atrial natriuretic peptide, ANP), 부신피질자극호르몬, otropin), 피질자극호르몬 방출호르몬, 니트로프러시드나트륨(sodium nitroprusside), 히드랄라진(hydralazine), 아데노신 삼인산, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 인산디에스테르 가수분해 효소 억제제 등), 세포 괴사 억제제(예를 들어 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노말레이미드, 디티오카르bam판피롤리딘 또는 클론아제팜), TNF- α 억제제 및/또는 산소운반성 퍼플루오로카본(브롬화퍼플루오로옥틸, 브롬화퍼플루오로데실 등)을 들 수 있다.

[0109] 줄기세포 수집용 조성액은 금속단백 분해효소, 세린 단백질 가수분해 효소, 중성 단백질 가수분해 효소, 리보핵산 가수분해효소, 디옥시리보핵산 가수분해 효소 등의 조직 분해 효소를 하나 이상 갖출 수 있다. 이러한 효소에는 콜라겐 분해 효소(예를 들어 콜라겐 분해효소 I, II, III 또는 IV, *Clostridium histolyticum* 유래 콜라겐 분해 효소 등), 디스파제(dispsase), 터모리신(thermolysis), 엘라스타제, 트립신, 리버라제(LIBERASE), 히알루로니다제(hyaluronidase) 등이 포함되지만 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0110] 줄기세포 수집용 조성액은 살균 또는 정균(靜菌 bacteriostatic) 용도에 유효한 분량의 항생제를 포함할 수 있다. 몇몇 비제한적 실시 태양에서, 이 항생제는 마크로리드(macrolide, 예를 들어 토브라마이신(tobramycin)), 세팔로스포린(세팔렉신(cephalexin), 세프라딘(cephradine), 세프록сим(cefuroxime), 세프로질(cefprozil), 세파클로(cefaclor), 세펙сим(cefixime) 또는 세파드록실(cefadroxil), 클라리트로마이신(clarithromycin), 에리도로마이신, 페니실린(페니실린 V 등) 또는 퀴놀론(오플록사신(ofloxacin), 시프로플락신(ciprofloxacin) 또는 노르플록사신(norfloxacin)), 테트라사이클린, 스트렙토마이신이다. 특정 실시 태양에서, 이 항생제는 그램 양성 및/또는 그램 음성 세균, 예를 들어 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 등에 대한 활성이 있다.

[0111] 줄기세포 수집용 조성액은 다음 화합물을 하나 이상 갖추고 있을 수 있다:

[0112] 아데노신(약 1 mM에서 약 50 mM로), D-포도당(약 20 mM에서 약 100 mM), 마그네슘 이온(약 1 mM에서 약 50 mM), 분자량 20,000 달톤을 넘는 거대분자(예를 들어 합성 또는 천연 콜로이드, 텍스트란 등의 다당류 또는 폴리에틸렌 글리콜)로서 한 실시 태양에서는 내피의 정상적인 상태와 세포 생존능을 유지하기에 충분한 분량(약 25 g/L에서 약 100 g/L, 또는 약 40 g/L에서 약 60 g/L), 항산화제(예를 들어 약 2 μ M 내지 약 100 μ M 농도의 부틸화 수산화아니솔, 부틸화 수산화톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E), 환원제(예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 5 mM 농도의 N-아세틸시스테인), 세포로의 칼슘 유입을 방지하는 제제(약 2 μ M 내지 약 25 μ M의 베라파밀(verapamil)), 니트로글리세린(예를 들어 약 0.05 g/L 내지 약 0.2 g/L), 항응고제로서 한 실시 태양에서는 잔류 혈액의 응고를 막기에 충분한 양(예를 들어 혜파린 또는 히루딘 약 1000 단위/L 내지 약 100,000 단위/L), 또는 아밀로리드(amiloride) 함유 화합물(예를 들어 아밀로리드, 아밀로리드에틸이소프로필, 아밀로리드헥사메틸렌, 아밀로리드디메틸 또는 아밀로리드이소부틸 약 1.0 μ M 내지 약 5 μ M).

[0113] 3.2 태반의 수집과 취급

- [0114] 일반적으로 사람 태반은 출산 후 태반을 압박 방출한 직후에 회수된다. 바람직한 실시 태양에서 이러한 태반은 환자의 완전한 병력을 얻은 후 이를 그 태반에 연관지은 다음 환자에게 충분한 설명 이후 동의를 받아서 회수된다. 이러한 병력 기록은 분만 이후에도 계속 기록되는 것이 바람직하다. 이러한 병력 기록은 태반 또는 그로 부터 얻은 줄기세포의 후속 이용을 조화시키는데 쓰일 수 있다. 예를 들어, 사람 태반 줄기세포는 병력을 감안하여, 상기 태반에 관련된 신생아 또는 그 신생아의 부모, 형제나 다른 친척의 개인화된 의료(personalized medicine)에 쓰일 수 있다.
- [0115] 태반 줄기세포의 회수 전에 제대혈과 태반 혈액을 제거하게 된다. 몇몇 실시 태양에서 분만 후 태반 속 제대혈을 제거하게 된다. 이러한 태반에 대해서는 통상적인 제대혈 회수 방법을 사용할 수 있다. 바늘 또는 카뉼라(cannula)를 써서, 중력을 이용하여 태반을 실혈(exsanguination)하는 것이 전형적이다(Anderson의 미국 특허 제5,372,581호, Hessel 외 미국 특허 제5,415,665호를 보라). 이 바늘 또는 카뉼라는 텃줄 정맥에 대개 놓이고 되고, 태반을 부드럽게 마사지하여 제대혈이 태반으로부터 빠져나오는 것을 돋는다. 이러한 제대혈 회수법은 상업적으로, 예를 들어 미국 뉴저지주 Cedar Knolls의 LifeBank Inc., ViaCord, Cord Blood Registry나 Cryocell을 통하여 이루어질 수 있다. 바람직하게는, 이러한 태반을 다른 조작 없이 중력만으로 방혈시켜 제대혈 회수 과정에서의 조직 손상을 최소화한다.
- [0116] 태반은 제대혈을 회수하고 줄기세포를 수집하기 위한 예를 들어 관류 또는 조직 분리를 위하여 분만 장소나 분만실로부터 다른 장소, 예를 들어 실험실로 운반되는 것이 전형적인 경우이다. 이러한 태반은 멸균되고, 단열된 운반 장비(태반 온도를 20~28°C로 유지), 예를 들어 멸균 접착(zip-lock) 플라스틱백에 태아에 가까운 부위의 텃줄을 집게로 집은 태반을 단열 용기에 담아서 운반되는 것이 바람직하다. 다른 실시 태양에서 이러한 태반은 2005년 9월 19일 출원 미국 특허 출원 제11/230,760에 기술된 것과 실질적으로 같은 제대혈 수집 키트에 담겨 운반된다. 이 태반은 분만 후 4~24 시간 안에 실험실로 운반되는 것이 바람직하다. 몇몇 실시 태양에서 태아에 가까운 쪽 텃줄을 집게로 집게 되는데, 이때 제대혈 회수 전에 태반 원반(placental disk)의 삽입 지점으로부터 4~5 cm 내 위치를 찾는 것이 바람직하다. 다른 실시 태양에서 태아에 가까운 쪽 텃줄은 제대혈 회수 후이고 태반의 후속 처리 전에 집게로 집히게 된다.
- [0117] 줄기세포 수집 전에 태반을 멸균 조건에서 실온 또는 5~25°C의 온도에서 저장할 수 있다. 이러한 태반은 48 시간보다 더 긴 기간 동안 저장될 수도 있으며, 바람직하게는 잔류 제대혈을 모두 제거하기 위한 태반 관류 4~24 시간 전까지 저장하게 된다. 이 태반은 5~25°C 온도에서 항응고제 용액 속에 저장되는 것이 바람직하다. 적절한 항응고제 용액은 이 분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 혜파린 또는 워페린나트륨(warfarin sodium)을 쓸 수 있다. 바람직한 실시 태양에서, 이 항응고제 용액은 혜파린 용액(예를 들어 1:1000 희석 용액에서 1% w/w)을 포함한다. 이렇게 실혈된 태반의 저장 시간은 태반 줄기세포를 수집하기 36 시간 전을 넘기지 않는 것이 바람직하다.
- [0118] 위에 기술한 취지대로 수집과 준비를 마친 포유류 태반 또는 그의 일부분으로부터 종래 기술에 따른 모든 방법, 예를 들어 관류 또는 하나 이상의 조직 파괴 효소를 이용한 소화 등의 파괴에 의하여 줄기세포를 얻을 수 있다.
- [0119] 3.3 태반 조직의 물리적 파괴와 효소 소화**
- [0120] 한 실시 태양에서, 줄기세포는 물리적 파괴, 예를 들어 태반의 효소 소화에 의하여 포유류 태반으로부터 얻어진다. 본 발명에 따른 줄기세포 수집용 조성액에 접촉하고 있는 채로 이 태반 또는 그 일부분을 예를 들어, 갈거나, 잡아 떼거나, 저미거나, 네모난 조각으로 썰거나, 잘게 썰거나, 액체에 담그어 연화시키는 등으로 처리할 수 있고 이어 하나 이상의 효소로 조직을 소화할 수 있다. 이러한 태반 또는 그 일부분을 하나 이상의 효소로 물리적으로 파괴하고 소화하여, 얻은 물질을 본 발명의 상기 줄기세포 수집용 조성액에 담그거나 섞을 수 있다. 예를 들어 트리판블루 배제법에 의하여 측정한 상기 장기 속의 세포 중 생존 세포 비율이 다수인 한, 바람직하게는 과반수인 한, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%인 한 어떠한 물리적 파괴 법도 사용할 수 있다.
- [0121] 태반은 물리적 파괴 및/또는 효소 소화와 줄기세포 회수 단계 전에 구성 성분들로 나뉠 수 있다. 예를 들어, 태반 줄기세포는 양막, 융모막, 태반엽, 또는 이들의 모든 조합으로부터 얻을 수 있다. 제대 줄기세포를 또한 본 발명의 방법에 쓰일 수 있다. 특정 실시 태양에서, 태반 줄기세포는 양막과 융모막을 함유한 태반 조직에서 얻는다. 태반 줄기세포는 태반 조직의 작은 덩어리, 예를 들어 부피가 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 약 1000 mm³인 태반 조직의 덩어리를 파괴하여 얻는 것이 전형적인 경우이다.

[0122]

바람직한 줄기세포 수집용 조성액은 조직 파괴 효소를 하나 이상 갖추고 있다. 효소 소화는 여러 효소의 조합, 예를 들어 매트릭스 금속단백 분해 효소와 중성 단백질 분해 효소나 예를 들어 콜라겐 분해 효소와 디스파제의 조합을 이용하면 바람직하다. 한 실시 태양에서는 히알루론산의 소화를 위하여 태반 조직의 효소 소화에서 금속단백 분해 효소, 중성 단백 분해 효소와 점액 용해성(mucolytic) 효소의 조합을 사용하는데, 이를 테면 콜라겐 분해 효소, 디스파제와 히알루로니다제의 조합 또는 LIBERASE(미국 인디아나주 인디아나폴리스 소재 베링거 만하임 회사)과 히알루로니다제의 조합으로 이루어진 효소 조합을 사용한다. 태반 조직 파괴에 쓰일 수 있는 다른 효소로는 파파인, 디옥시리보핵산 가수분해효소와 트립신, 키모트립신 또는 엘라스타제 등의 세린 단백 분해 효소를 들 수 있다. 세린 단백 분해 효소는 혈청 속 알파-2-마이크로글로불린에 의하여 억제될 수 있으므로 소화에 사용되는 배지는 혈청이 포함되어 있지 않아야 한다. EDTA와 디옥시리보핵산 분해 효소는 세포 회수율을 높이기 위하여 효소 소화에 흔히 사용된다. 끈적한 소화물 속에 줄기세포가 갇히는 일을 막기 위하여 소화물을 회석하는 것이 바람직하다.

[0123]

조직 소화 효소의 모든 조합을 사용할 수 있다. 조직 소화 효소의 전형적인 농도로는 예를 들어 콜라겐 분해 효소 I과 IV의 경우 50~200 단위/mL, 디스파제의 경우 10 단위/mL, 엘라스타제의 경우 10~100 단위/mL을 들 수 있다. 태반 줄기세포를 방출하기 위하여 단백질 분해 효소를 조합하여, 즉 둘 이상의 단백질 분해 효소를 같은 효소 소화 반응에 사용하거나, 순서대로 사용할 수 있다. 예를 들어, 한 실시 태양에서는 태반 또는 그 일부분을 30 분 동안 적절한 양의 2 mg/mL 콜라겐 분해 효소 I로 먼저 소화시킨 다음, 37°C에서 10 분 동안 0.25% 트립신으로 소화한다. 다른 효소를 사용한 다음 이어서 세린 단백 분해 효소를 이용하는 것이 바람직하다.

[0124]

다른 실시 태양에서 상기 줄기세포를 함유하는 상기 줄기세포 수집용 조성액 또는 줄기세포 수집용 조성액에서 줄기세포를 분리하기 전에 이 조직을 파괴 및/또는 소화한 용액에, 퀼레이트제, 예를 들어 에틸렌글리콜 비스(2-아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산(EGTA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 가하여 이 조직을 더 파괴할 수 있다.

[0125]

온전한 태반 또는 태아와 모체 세포 양쪽을 포함하는 그 태반의 일부(예를 들어, 태반에서 융모막과 태반엽을 함유하는 부분)를 이용하는 경우, 수집한 상기 태반 줄기세포는 모체와 태아 양쪽에서 유래한 태반 줄기세포를 포함한다는 것을 이해할 필요가 있다. 모체 세포(양막 등)를 전혀 가지고 있지 않거나 또는 무시할 수 있는 정도로 가지고 있는 태반의 일부분이 쓰인 경우는 수집한 상기 태반 줄기세포가 거의 전적으로 태아 태반 줄기세포이다.

[0126]

3.4 태반 관류

[0127]

태반 줄기세포는 또한 포유류 태반을 관류하여 얻을 수 있다. 포유류 태반을 관류하여 줄기세포를 얻는 방법, 예를 들어 Hariri의 미국 특허 제 7,045,148호와 2005년 12월 29일자의 관련 미국 예비출원 제60/754,969호 "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"에 개시되어 있다.

[0128]

태반 줄기세포는 관류로써, 이를 테면 관류 용액으로서 줄기세포 수집용 조성액을 이용하여 태반 혈관계를 관통하여 얻을 수 있다. 한 실시 태양에서는 배꼽 동맥과 배꼽 정맥 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 관류 용액을 흘려보냄으로써 포유류 태반을 관류할 수 있다. 관류 용액을 태반에 흘려보내는 것은 예를 들어 중력을 이용하여 태반으로 흐르게 함으로써 이를 수 있다. 바람직하게는, 이 관류 용액을 연동(運動 peristaltic) 펌프 등의 펌프를 이용하여 강제로 태반에 주입한다. 배꼽 정맥은 예를 들어 멸균 도관(tubing)과 같은 살균된 연결부에 이어진 테플론 또는 플라스틱 재질 카뉼라 등의 카뉼라로 삽관될 수 있다. 이러한 살균된 연결부는 관류 매니폴드(manifold)에 연결된다.

[0129]

관류를 준비하면서 태반은 배꼽 동맥과 배꼽 정맥이 태반의 가장 높은 지점에 자리하도록 놓는(예를 들어 매달아 두는) 것이 바람직하다. 이 태반은 본 발명의 줄기세포 수집용 조성액 등의 관류 용액을 태반 혈관계 또는 태반 혈관계와 주변 조직에 통과시켜 관류할 수 있다. 한 실시 태양에서는 배꼽 동맥과 배꼽 정맥이 동시에 피펫에 연결되어 있는데, 이 피펫은 유연한 연결부를 통하여 관류 용액 저장소에 이어져 있다. 이 관류 용액은 배꼽 정맥과 동맥으로 흘러간다. 이 관류 용액은 상기 혈관들로부터 태반 주변 조직으로 스며나오고/스며나오거나 이를 혈관을 따라 주변 조직으로 흘러들어가며, 태반 표면으로부터 임신 도중 자궁에 붙인 적당한 열린 용기 속에 모이게 된다. 이 관류 용액은 한편 텃줄의 구멍을 통하여 주입할 수도 있으며, 모체 자궁벽에 접하고 있는 태반의 벽에 있는 구멍 속으로 흘러들어가거나 구멍으로부터 걸려나올 수 있다. 다른 실시 태양에서는 이 관류 용액으로 하여금 배꼽 정맥을 지나게 하여 배꼽 동맥에서 모으거나 배꼽 동맥을 지나게 하여 배꼽 정맥에

서 모을 수 있다.

[0130] 한 실시 태양에서 태아쪽 텃줄은 관류 동안 집게로 집히게 되며, 더 바람직하게는 태반 원반에 텃줄이 삽입되는 지점에서 4~5 cm 이내 위치에서 집게로 집히게 된다.

[0131] 실혈(exsanguination) 과정에서 포유류 태반으로부터 처음 얻은 관류액은 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구 때문에 색깔을 띠는 것이 일반적이다. 이 관류액은 관류가 진행됨에 따라서 색깔이 옅어지며, 잔류 제대혈 세포들은 태반에서 쟁겨 나간다. 일반적으로 태반을 처음에 실혈하는데는 30에서 100 mL의 관류액이면 충분하지만 관측된 결과에 따라 관류액의 양을 가감할 수 있다.

[0132] 태반 줄기세포를 수집하는데 쓰이는 관류액의 양은 수집할 줄기세포의 수, 태반의 크기, 한 태반에서 수집할 회수 등에 따라 달라진다. 많은 실시 태양에서, 관류액의 양은 50 mL 내지 5000 mL, 50 mL 내지 4000 mL, 50 mL 내지 3000 mL, 100 mL 내지 2000 mL, 250 mL 내지 2000 mL, 500 mL 내지 2000 mL 또는 750 mL 내지 2000 mL이다. 실혈 후 700~800 mL의 관류액으로 태반을 관류하는 것이 전형적인 경우이다.

[0133] 태반을 여러 시간 또는 여러 날에 걸쳐서 여러 번 관류할 수 있다. 여러 번 태반을 관류하는 경우, 무균 조건 하의 용기 또는 적절한 담체 속에서 태반을 유지하고 항응고제(예를 들어 헤파린, 워페린나트륨, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)를 포함하거나 포함하지 않은 줄기세포 수집용 조성액 또는 표준 관류 용액(예를 들어 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 정상적인 식염수)으로 관류할 수 있는데, 이 조성액 또는 관류 용액은 항생제(예를 들어 β -메르캅토에탄올(0.1 mM)이나 스트렙토마이신(예를 들어 40~100 μ g/mL 농도로), 페니실린(예를 들어 40 단위/mL), 암포테리신 B(예를 들어 0.5 μ g/mL) 등의 항생제)를 더 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 한 실시 태양에서 분리된 태반은 관류된 액체를 수집하지 않은 채로 일정 기간 유지되거나 배양되는데, 여기서 이 태반은 관류와 관류물 수집 이전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 시간 동안, 혹은 이를, 사흘 또는 더 오랜 동안 유지되거나 배양된다. 이렇게 관류된 태반은 한 번 또는 여러 번에 걸쳐 유지될 수 있는데, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 시간 동안 혹은 이를, 사흘 또는 더 오랜 동안 유지될 수 있고, 이어서 두 번째 관류, 예를 들어 700~800 mL의 관류액으로 관류될 수 있다. 이 태반을 1, 2, 3, 4, 5회 또는 더 많이 관류할 수 있는데, 예를 들어 매 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 관류할 수 있다. 바람직한 실시 태양에서 이러한 태반의 관류와 관류 용액, 예를 들어 줄기세포 수집용 조성액의 수집은 회수한 유핵 세포 수가 100 세포/mL 보다 아래로 떨어질 때까지 반복된다. 서로 다른 시점에서 얻은 관류물을 개별적으로 더 처리하여 시간 의존적인 세포군, 예를 들어 줄기세포군을 회수할 수도 있다. 서로 다른 시점에서 얻은 관류물을 한 데 모을 수도 있다.

[0134] 특정 이론에 구애받고자 하는 것은 아니지만, 태반을 실혈 후 충분한 시간 동안 관류한 다음에 태반 줄기세포는 실혈되고 관류된 태반의 미세혈액순환 속으로 옮겨가서 본 발명의 방법에 따라 채집되는 것으로 생각되는데, 채집은 관류에 의하여 수집 용기 속으로 씻어넣는 방식이 바람직하다. 분리된 태반을 관류하면 잔류 제대혈을 제거할 수 있을 뿐 아니라 태반에 산소를 포함하는 적절한 양분을 공급할 수 있다. 이 태반은 배양되거나 제대혈을 제거하는데 쓰인 것과 유사한 용액으로 관류될 수 있는데, 이 용액에는 항응고제를 넣지 않는 것이 바람직하다.

[0135] 본 발명에 따른 방법으로 관류하면 포유류 태반을 상기 용액으로 관류하지 않고, 줄기세포를 얻기 위하여 다른 처리(예를 들어 효소 소화 등의 조직 파괴)를 하지도 않은 경우와 견주었을 때보다 유의미하게 더 많은 수의 줄기세포를 포유류 태반에서 얻을 수 있다. 여기서 "유의미하게 더 많은"이란 적어도 10% 이상 더 많은 것을 뜻한다. 본 발명에 따라 관류하면 유의미하게 더 많은 태반 줄기세포를 얻을 수 있는데, 예를 들어 태반 또는 그 일부분이 배양된 배지로부터 얻을 수 있는 태반 줄기세포 수보다 더 많다.

[0136] 줄기세포는 하나 이상의 단백 분해 효소 또는 다른 조직 파괴성 효소를 갖추고 있는 용액으로 관류하여 분리할 수 있다. 특정 실시 태양에서, 태반 또는 그 일부분(예를 들어 양막, 양막과 용모막, 태반 소엽(placental lobule) 또는 태반엽 혹은 이들의 모든 조합)의 온도는 25~37°C로 조절되고, 이를 200 mL의 배양 배지 속에서 하나 이상의 조직 파괴성 효소와 30 분 동안 배양하게 된다. 이 관류물로부터 세포를 수집하고, 4°C로 식힌 다음, 5 mM EDTA, 2 mM 디티오프레이탈과 2 mM 베타메르캅토에탄올을 함유하는 차가운 억제제 혼합물로 세척한다. 몇 분 후 줄기세포를 찬(예를 들어 4°C) 본 발명의 줄기세포 수집용 조성액으로 세척한다.

[0137] 이러한 결러냄(pan) 방식, 즉 관류물이 태반의 모체쪽을 통하여 스며나오면 이를 수집하는 방식은 모체와 태아 세포가 섞여 나오게 된다는 것을 이해할 필요가 있다. 그 결과, 이 방법에 의하여 수집한 세포는 태아와 모체

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

[0138] 3.5 태반 줄기세포의 분리, 분류와 특성 파악

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

세포 펠렛은 신선한 줄기세포 수집용 조성액 또는 줄기세포 유지에 적합한 배지, 예를 들어 2 단위/mL 해파린과 2 mM EDTA를 함유한 IMDM 무혈청 배지(미국 뉴욕주 GibcoBRL)에 재현탁된다. 단핵 세포 총분획을 이를 테면 Lymphoprep(노르웨이 오슬로Nicommed Pharma사) 등으로 (제조사의 설명에 따라) 분리한다.

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

관류나 소화에 의하여 얻은 태반 세포는 예를 들어 차등 트립신 처리(differential trypsinization)로 더 분리되거나, 처음에 이를 이용하여 분리할 수 있는데, 여기서는 0.2% EDTA를 함유한 0.05% 트립신 용액(미국 미주리 주 세인트루이스 Sigma사)을 사용한다. 차등 트립신 처리는 태반 줄기세포가 플라스틱 표면으로부터 약 5분 이내에 탈착하는데 반하여 다른 부착 세포군은 20~30 분보다 더 많은 배양 시간을 요하는 것이 전형적인 경우이기 때문에 가능하다. 탈착된 태반 줄기세포는 트립산 처리와 트립신 중화 용액(Cambrex사의 TNS) 등을 이용한 트립신 중화 처리 후에 수집할 수 있다. 부착 세포를 분리하는 한 실시 태양에서는 예를 들어, $5\sim10 \times 10^6$ 개의 세포를 담은 분액을 여러 개의 T-75 플라스크에 각각 나누어 담게 되는데, 피브로넥틴 피복 T-75 플라스크가 바람직하다. 이 실시 태양에서는 세포를 시판되는 중간엽 줄기세포 성장 배지(Cambrex사의 MSCGM)으로 배양하고 조직 배양기(37°C , 5% CO_2) 속에 놓을 수 있다. 10~15 일 후 PBS 세척으로 비부착 세포를 상기 플라스크로부터 제거한다. 이어 PBS를 MSCGM으로 대체한다. 바람직하게는 플라스크를 날마다 점검하여 다양한 부착 세포 유형을 확인하는데, 특히, 섬유모세포 유형의 세포를 확인하고 세포군의 종족 여부를 점검한다.

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

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

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

[0145] 한 세포 분류법에서는 태반에서 온 줄기세포를 CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 및/또는 HLA-G 표지의 발현 여부에 따라 분류한다. 이러한 분류는 배양시 세포 부착 특성에 따라 줄기세포를 선별하는 방법과 함께 이루어질 수도 있다. 예를 들어 세포 부착 선별 단계는 표면 표지 발현에 따른 세포 분류 단계 전 또는 후에 수행할 수 있다. 일례로 한 실시 태양에서는 세포를 먼저 CD34의 발현 여부에 따라 분류하는데, CD34⁻ 세포는 남기고, CD200⁺HLA-G⁺인 세포는 다른 모든 CD34⁻ 세포로부터 분리한다. 다른 실시 태양에서는 태반에서 얻은 세포를 CD200 및/또는 HLA-G 표지의 발현 여부에 따라 분류하는데, 예를 들어 이들 표지 중 어느 하나라도 나타내는 세포는 후속 용도를 위하여 분리한다. 특정 실시 태양에서는 예를 들어 CD73 및/또는 CD105의 발현 여부 혹은 항체 SH2, SH3 또는 SH4가 인식하는 항원 결정기의 존부 또는 CD34, CD38 또는 CD45의 미발현 여부에 따라 CD200 및/또는 HLA-G를 발현하는 세포를 추가적으로 분류할 수 있다. 한 실시 태양에서는 예를 들어, 태반 세포를 CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38과 CD45의 발현 또는 미발현에 의거하여 분류하고, CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻이고 CD45⁻인 태반 세포를 후속 용도를 위하여 다른 태반 세포로부터 분리한다.

[0146] 한 실시 태양에서는 자기 비드를 이용하여 세포를 분리한다. 입자가 자기 비드(지름 0.5~100 μm)에 결합하는 능력에 따라 입자를 분리하는 방법인 자기 활성화 세포 분류(MACS)에 의하여 이 세포들을 분류할 수 있다. 이 자성의 미세구에는 유용한 변형을 다양하게 가할 수 있는데, 특정 세포 표면 분자 또는 불완전 항원(hapten)을 인식하는 항체를 공유 결합으로 연결하는 것 역시 이 변형에 포함된다. 이어서 이러한 비드를 세포와 섞어 주어 결합을 유도한다. 이 세포를 자기장 속에 통과시켜 특정 세포 표면 표지를 가지는 세포를 분리해 낸다. 한 실시 태양에서는 이들 세포를 이어서 분리한 다음 다른 세포 표면 표지들에 특이적인 항체와 결합한 자기 비드와 다시 섞어주게 된다. 이들 세포를 다시 자기장 속에 통과시켜 상기 항체 양쪽에 결합한 세포를 분리한다. 이러한 세포는 클론 분리를 위하여 각각의 미량역가판(microtiter dish)에 희석해 넣을 수 있다.

[0147] 한편 세포 형태와 성장 특성을 바탕으로 하여 태반 세포를 특성화 및/또는 분류할 수 있다. 예를 들어 태반 세포를 배양시 섬유모세포 유사(fibroblastoid) 형상을 나타내는 것으로 그 특성을 파악 및/또는 섬유모세포 유사 형상을 가지는지 여부에 따라 선별할 수 있다. 태반 줄기세포는 또한 배아유사체 형성 능력에 따라 특성 파악 및/또는 선별할 수 있다. 예를 들어 한 실시 태양에서는, 섬유모세포 유사 형상이고, CD73 및 CD105를 발현하며, 배양시 하나 또는 그 이상의 배아유사체를 형성하는 태반 세포를 나머지 태반 세포로부터 분리한다. 다른 실시 태양에서는, 배양시 하나 이상의 배아유사체를 생성하는 OCT-4⁺ 태반 세포를 나머지 태반 세포로부터 분리한다.

[0148] 다른 실시 태양에서는 태반 줄기세포를 콜로니 형성 단위 분석(colony forming unit assay)를 이용하여 확인하고 특성 파악하게 된다. 콜로니 형성 단위 분석은 이 분야에서 널리 알려져 있는데, Mesen Cult(캐나다 브리티시 콜럼비아 주 밴쿠버의 Stem Cell Technologies, Inc.의 상표) 배양 배지를 예로 들 수 있다.

[0149] 태반 줄기세포의 생존능, 증식 잠재성과 수명은 이 분야에 알려진 표준적인 기법을 이용하여 평가할 수 있는데, 이들 기법의 예는 다음과 같다: 트리판블루 배제 분석, 디아세트산플루오레사인 흡수 분석, (생존능 평가를 위한)요오드화프로피듐 흡수 분석, 티미딘 흡수 분석, (증식을 평가하는) MTT 세포 증식 분석. 수명도 이 분야에 잘 알려진 방법, 예를 들어 장기 배양시 세포군 배증의 최대값을 측정하는 방법으로 알아낼 수 있다.

[0150] 태반 줄기세포는 이 분야에 잘 알려진 기법을 이용하여 나머지 태반 세포로부터 분리할 수 있는데, 이러한 기법은 다음과 같은 것이 있다: 원하는 세포의 선택적인 성장(적극적 선별), 원하지 않는 세포의 선택적 파괴(소극적 선별), 대두 응집소(agglutinin) 등에 대한 혼합 세포군 내의 차별적 응집성에 바탕을 둔 분리법, 냉동-해동 과정, 여과, 통상적인 원심분리와 구역 원심분리, 원심분리 세정(centrifugal elutriation, counter-streaming centrifugation), 단위 중량(unit gravity) 분리, 대향류 분포법(countercurrent distribution), 전기 영동 등.

[0151] 4. 태반 줄기세포의 배양

[0152] 4.1 배양 배지(Culture media)

[0153] 분리된 태반 줄기세포 또는 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포가 자라나오는 태반 조직은 세포 배양을 개시하거나 파종하는데 쓰일 수 있다. 세포는 무균 조직 배양 용기로 옮겨지는데, 이 용기는 표면이 라미닌, 콜라겐

(예를 들어 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴과 세포와 막 단백질(미국 매사추세츠 주 Bedford의 BD Discovery Labware사의 MATRIGEL)과 같은 세포와 매트릭스 또는 리간드로 피복되거나 피복되지 않을 수 있다.

[0154] 이 분야에서 줄기세포 배양 용도로 적합하다고 인정받은 모든 배양 배지 또는 배양 조건을 이용하여 태반 줄기 세포를 배양할 수 있다. 배양 배지는 혈청을 함유하는 것이 바람직하다. 태반 줄기세포는 예를 들어 다음 배양 배지를 이용할 수 있다: ITS(인슐린-트랜스페린-셀렌), LA+BSA(리놀레산+소 혈청 알부민), 포도당, L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-I와 페니실린/스트렙토마이신 함유 DMEM-LG(Dulbecco's Modified Essential Medium, 저포도당)/MCDB 201(병아리 섬유모세포 기저(basal) 배지),

[0155] 10% 소 태아 혈청(FBS) 함유 DMEM-HG(고포도당),

[0156] 15% FBS 함유 DMEM-HG,

[0157] 10% FBS, 10% 말 혈청과 하이드로코르티손 함유 IMDM (Iscove 변형 Dulbecco 배지),

[0158] 10% FBS, EGF와 헤파린 함유 M199,

[0159] 10% FBS, 글루타맥스(상표)와 젠타마이신 함유 α-MEM(최소 필수 배지),

[0160] 10% FBS, 글루타맥스와 젠타마이신 함유 DMEM 등.

[0161] 바람직한 배지는 2% FBS, ITS, LA+BSA, 포도당, L-아스코르브산, PDGF, EGF와 페니실린/스트렙토마이신 함유 DMEM-LG/MCDB-201이다.

[0162] 태반 줄기세포 배양에 쓰일 수 있는 다른 배양 배지에는 DMEM(고농도 또는 저농도의 포도당), Eagle 기본 배지, Ham F10 배지(F10), Ham F-12 배지(F12), Iscove 변형 Dulbecco 배지, 중간엽 줄기세포 성장 배지(MSCGM), Liebovitz L-15 배지, MCDB, DMIEM/F12, RPMI 1640, 개량 DMEM (Gibco), DMEM/MCDB201(시그마사)와 CELL-GRO FREE가 포함된다.

[0163] 이 배양 배지는 하나 또는 그 이상의 성분을 보충받을 수 있는데 이러한 성분으로는 혈청[예를 들어 바람직하게는 약 2~15%(v/v)인 소 태아 혈청, 말 혈청(ES), 사람 혈청(HS)], 바람직하게는 약 0.001%(v/v)인 베타-메르캅토에탄올(BME), 하나 이상의 성장 인자, 예를 들어 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 표피 성장 인자(EGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-I), 백혈병 억제 인자(LIF), 혈관내피 성장 인자(VEGF)와 에리드로포이에틴이 있으며, L-발린을 포함하는 아미노산, 그리고 미생물 오염을 조절하기 위한 하나 또는 그 이상의 항생제 및/또는 항진균약(antimycotic)이 있는데 항생제 및/또는 항진균약에는 페니실린 G, 황산스트렙토마이신, 암포테리신 B, 젠타마이신과 니아스타틴이 있으며 단독으로 또는 이들을 조합하여 쓸 수 있다.

4.2 태반 줄기세포의 증폭과 증식

[0165] 분리된 태반 줄기세포 또는 분리된 줄기세포군(예를 들어 생체 내에서 줄기세포 또는 줄기세포군에 정상적으로 결부되어 있는 태반 세포들을 적어도 50% 떼어낸 줄기세포 또는 줄기세포군)을 얻은 뒤에는 이 줄기세포 또는 줄기세포군을 시험관내에서 증식시키고 증폭시킬 수 있다. 예를 들어 태반 줄기세포군은 배양 접시, 플라스크, 다중웰 플레이트 등의 조직 배양 용기에서 그 태반 줄기세포가 세포 합류(confluence) 조건의 70~90%에 이르는데 충분한 시간, 즉 이 줄기세포와 그 자손이 조직 배양 용기 표면적의 70~90%를 차지할 때까지 배양할 수 있다.

[0166] 태반 줄기세포는 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 파종할 수 있다. 예를 들어 이 세포들을 낮은 밀도(예를 들어 1 cm² 당 약 1000에서 약 5000 세포) 내지 높은 밀도(1 cm² 당 약 50,000 세포 또는 그 이상)로 파종할 수 있다. 한 바람직한 실시 태양에서는 이를 세포를 공기 중 부피비 약 0 내지 5% 이산화탄소 속에서 배양한다. 몇몇 바람직한 실시 태양에서는 이를 세포를 공기 중 부피비 약 2 내지 약 25% 산소 속에서 배양하고, 바람직하게는 약 5 내지 약 20퍼센트 산소를 사용한다. 이를 세포는 약 25°C 내지 약 40°C, 바람직하게는 37°C에서 배양하게 된다. 이를 세포는 배양기 속에서 배양하는 것이 바람직하다. 배양 배지는 정지상이거나 교반될 수 있는데, 예를 들어 생반응기를 이용할 수 있다. 태반 줄기세포는 낮은 산화성 스트레스(글루타티온의 첨가, 아스코르브산, 카탈라아제, 토코페롤, N-아세틸시스테인 등) 하에서 성장하는 것이 바람직하다.

[0167] 70%~90% 세포 합류를 이룬 다음에는 이를 세포를 계대할 수 있다. 예를 들어, 공기 기술을 이용하여 이를 세포를 효소 처리, 이를 태면 트립신 처리하여 조직 배양 표면으로부터 떼어낼 수 있다. 피펫으로 세포를 떼어내고

그 세포 수를 세어 약 20,000~100,000 줄기세포, 바람직하게는 약 50,000 줄기세포를 신선한 배양 배지를 담고 있는 새 배양 용기에 옮겨 계대한다. 이 새로운 배양 배지는 상기 줄기세포를 들어낸 배양 배지과 같은 종류인 것이 전형적인 경우이다. 본 발명은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 회, 또는 그 이상 계대한 태반 줄기세포군도 망라하고 있다.

[0168] 4.3 태반 줄기세포군

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

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

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

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

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

분리된 태반 줄기세포군을 하나 이상의 비줄기세포 또는 비태반 세포 세포군과 혼합할 수 있다. 예를 들어 분리된 태반 줄기세포군을 혈액(예를 들어 태반 혈액 또는 제대혈), 혈액 유래 줄기세포(예를 들어 태반 혈액 또는 제대혈 유래 줄기세포), 혈액 유래 유핵 세포군, 골수 유래 중간엽 세포, 골수 유래 줄기세포군, 미정제 골수, 성체(체세포) 줄기세포, 조직 내에 포함된 줄기세포군, 배양된 줄기세포, 완전 분화된 세포군(예를 들어 연골세포, 섬유모세포, 양막 세포, 뼈모세포, 근육 세포, 심근 세포 등) 등과 혼합할 수 있다. 분리된 태반 줄기세포군 속의 세포와 다수의 다른 유형 세포를, 각 세포군의 총 유핵세포수를 비교하여 혼합할 수 있는데 그 혼합 비율은 약 100,000,000:1, 50,000,000:1, 20,000,000:1, 10,000,000:1, 5,000,000:1, 2,000,000:1, 1,000,000:1, 500,000:1, 200,000:1, 100,000:1, 50,000:1, 20,000:1, 10,000:1, 5,000:1, 2,000:1, 1,000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:5,000, 1:10,000, 1:20,000, 1:50,000, 1:100,000, 1:500,000, 1:1,000,000, 1:2,000,000, 1:5,000,000, 1:10,000,000, 1:20,000,000, 1:50,000,000 또는 약 1:100,000,000이다. 분리된 태반 줄기세포군 속의 세포를 복수의 세포 유형을 가지는 복수의 세포들과 혼합할 수도 있다.

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

[0176] 5. 태반 줄기세포의 보존

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

[0178]

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

[0179]

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

[0180]

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

[0181]

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

[0182]

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

바람직하다.

[0183] 6. 태반 줄기세포의 용도

[0184] 6.1 태반 줄기세포 함유 조성물

[0185] 본 발명의 종양 세포 억제 방법에서는 태반 줄기세포 또는 그들로부터 얻은 생분자를 함유하는 조성물을 사용할 수 있다. 마찬가지 방식으로 본 발명에 따른 복수의 태반 줄기세포와 줄기세포군은 예를 들어 연구 또는 치료 용도에 사용하기 위하여, 생리학적으로 적합 또는 의학적으로 적합한 모든 화합물, 조성물 또는 장치와 결합하여 쓰일 수 있다.

6.1.1 냉동보존된 태반 줄기세포

[0187] 본 발명의 종양 세포 억제성 태반 줄기세포군은 장래의 사용을 위하여 보존, 예를 들어 냉동보존될 수 있다. 줄기세포와 같은 세포의 냉동 보존을 위한 방법은 잘 알려져 있다. 태반 줄기세포군은 개체에게 쉽게 투여할 수 있는 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어 본 발명은 의학 용도에 적합한 용기에 담긴 태반 줄기세포군을 제공한다. 이러한 용기의 예로는 무균 플라스틱백, 플라스크, 단지(jar) 또는 상기 태반 줄기세포군을 쉽게 꺼낼 수 있는 다른 용기를 들 수 있다. 예를 들어 이 용기는 혈액백 또는 다른 플라스틱, 수용 대상에게 정맥 투여하기 적합한, 의학적으로 허용되는 백일 수 있다. 이 용기는 통합한 줄기세포군의 냉동보존을 지원하는 것이 바람직하다.

[0188] 냉동보존된 면역억제성 태반 줄기세포군은 한 기증자 또는 여러 기증자로부터 유래한 태반 줄기세포를 포함할 수 있다. 이 태반 줄기세포군은 의도한 수용자와 완벽하게 HLA 유형이 맞거나, 부분적 또는 완전히 HLA-불일치 할 수 있다.

[0189] 따라서 본 발명의 한 실시 태양에서는 종양 세포 억제성 태반 줄기세포군을 용기에 담은 조성물을 제공한다. 한 특정 실시 태양에서는 이 줄기세포군을 냉동보준한다. 다른 특정 실시 태양에서는 이 용기가 백, 플라스크 또는 단지이다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 백이 무균 플라스틱 백이다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 백이 상기 태반 줄기세포군의 정맥 투여에 적합하거나, 이를 허용하거나 촉진한다. 이 백은 투여 전에 또는 도중에 약물 등의 용액이 하나 이상 상기 태반 줄기세포와 섞일 수 있도록 서로 연결된 내부 빈 공간(lumen) 또는 구획을 여러 가지고 있을 수 있다. 다른 구체적 실시 태양에서는 이 조성물이 통합 줄기세포군의 냉동보존을 촉진하는 화합물을 하나 이상 함유한다. 다른 구체적 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포군이 생리적으로 허용되는 수용액 속에 함유되어 있다. 더 특정한 실시 태양에서는 상기 생리적으로 허용되는 수용액이 0.9% NaCl 용액이다. 다른 구체적 실시 태양에서, 상기 태반 줄기세포군은 상기 줄기세포군의 투여 대상자와 HLA 유형이 일치하는 태반 세포를 함유한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 통합 줄기세포군은 적어도 부분적으로 상기 줄기세포군의 투여 대상자와 HLA-불일치하는 태반 세포를 함유한다. 다른 특정 실시 태양에서 상기 태반 줄기세포는 복수의 기증자에서 유래한 것이다.

6.1.2 약학 조성물

[0191] 종양 세포 억제성 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 생체 내에서 사용하기 위한 약학 조성물로 제형화할 수 있다. 이러한 약학 조성물은 태반 줄기세포군 또는 태반 줄기세포를 함유하는 세포군을 약학적으로 허용되는 담체속에 포함하고 있는데, 이러한 담체로는 식염수 또는 생체내 투여에 적합한 다른 생리적으로 허용되는 용액을 들 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 태반 줄기세포군 또는 본 명세서에서 언급한 태반 줄기세포 유형 중 아무 것이나 함유하여도 좋다. 본 발명의 약학 조성물은 태아, 모체 또는 양쪽 태반 줄기세포를 모두 갖추고 있을 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 나아가 단일 기증자 또는 그 태반이나 여러 기증자 또는 그 태반들에서 유래한 태반 줄기세포를 포함할 수 있다.

[0192] 본 발명의 약학 조성물은 종양 세포 억제성 태반 줄기세포를 얼마든지 함유할 수 있다. 예를 들어 여러 실시 태양에서 태반 줄기세포 1회 투여량은 적어도 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 이보다 더 많은 수의 태반 줄기세포를 함유하거나, 적어도 이 정도 수의 줄기세포를 함유하거나, 혹은 이 정도 수 이하의 줄기세포를 함유한다.

[0193] 본 발명의 약학 조성물은 세포 생존률이 50% 이상(즉 세포군 속의 세포 중 적어도 50%가 기능을 발휘하거나 살아 있음)인 세포군을 포함한다. 적어도 세포군 속 세포의 60%가 생존하고 있는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 상기 약학 조성물 속 세포군의 생존률이 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%이다.

[0194]

6.1.3 태반 줄기세포의 조건 배지

[0195]

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

[0196]

따라서 본 발명의 한 실시 태양에서는 태반 줄기세포 배양물로부터 얻은 배양 배지를 포함하는데, 여기서 상기 태반 줄기세포는 (a) 기질(substrate)에 부착하며, (b) CD200과 HLA-G를 발현하거나 CD73, CD105와 CD200을 발현하거나 CD200과 OCT-4를 발현하거나 CD73, CD105와 HLA-G를 발현하거나 CD73과 CD105를 발현하면서, 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하거나,

[0197]

OCT-4를 발현하면서 배아유사체의 형성이 가능한 조건하에서 상기 태반 줄기세포를 함유하는 태반 세포군을 배양하였을 때, 상기 세포군 속에서 하나 이상의 배아유사체가 형성되는 것을 촉진하고, (c) 종양 세포 또는 종양 세포군의 증식이나 성장을 측정 가능한 수준으로 억제한다. 특정 실시 태양에서 이 조성물은 복수의 상기 태반 줄기세포를 더 포함한다. 다른 특정 실시 태양에서 이 조성물은 복수의 비태반 세포를 포함한다. 더 구체적인 실시 태양에서는 상기 비태반 세포가 CD34⁺ 세포, 예를 들어 말초 혈액 조혈 전구세포, 제대혈 전구세포 또는 태반 혈액 조혈 전구세포와 같은 조혈 전구세포를 포함한다. 상기 비태반 세포는 또한 골수 유래 중간엽 줄기세포와 같은 중간엽 줄기세포 등의 다른 줄기세포를 포함할 수 있다. 상기 비태반 세포는 또한 하나 이상의 종류의 성체 세포 또는 성체 세포주일 수 있다. 다른 특정 실시 태양에서 이 조성물은 항증식제, 예를 들어 항MIP-1 α 또는 항MIP-1 β 항체를 포함한다.

[0198]

한 특정 실시 태양에서, 상기 태반 줄기세포 조건 배양 배지 또는 상충액은 태반 줄기세포 대 종양 세포의 비율을 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1 또는 약 5:1로 하여 복수의 종양 세포와 공동 배양한 복수의 태반 줄기세포로부터 얻은 것이다. 예를 들어 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 약 1×10^5 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^6 개의 태반 줄기세포, 약 1×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 약 1×10^8 개의 태반 줄기세포 또는 이보다 많은 세포를 함유하는 배양물로부터 얻을 수 있다. 다른 특정 태양에서 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^5 개의 종양 세포, 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^6 개의 종양 세포, 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^7 개의 종양 세포 또는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^8 개의 종양 세포를 함유하는 공동 배양물로부터 얻을 수 있다.

[0199]

종양 세포 성장 또는 증식을 억제하는 본 발명 방법의 다른 특정 태양에서 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 단독으로 또는 종양 세포와 함께 배양한 다수의 태반 줄기세포를 포함하는 배양물로부터 얻은 배양 배지 또는 상충액인데, 여기서 상기 조건 배지를 생산할 세포의 수는 그 조건 배지를 투여받을 개체의 체중을 기준으로 정한다. 예를 들어 이 조건 배양 배지 또는 상충액은 개체의 체중 1 kg 당 대략 1×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^3 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^4 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^5 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^6 개의 태반 줄기세포, kg 당 1×10^7 개의 태반 줄기세포, kg 당 5×10^7 개의 태반 줄기세포 또는 kg 당 1×10^8 개의 태반 줄기세포를 함유하는 배양물로부터 생산한 조건 배지 또는 상충액이다. 다른 특정 태양에서, 상기 조건 배양 배지 또는 상충액은 kg 당 약 1×10^3 내지 약 5×10^3 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^3 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^4 내지 약 5×10^4 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^4 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^5 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^6 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^7 개의 종양 세포, kg 당 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^8 개의 종양 세포를 함유하는 공동 배양물로부터 얻을 수 있다.

종양 세포, kg 당 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^7 개의 종양 세포 또는 kg 당 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 태반 줄기세포와 약 1×10^8 개의 종양 세포를 함유하는 공동 배양물에서 얻은 배양 배지 또는 상층액이다.

[0200] 한 특정 태양에서, 70 kg 체중의 개체에 투여하기 적합한 상기 조건 배지는 약 200 mL 배양 배지 속의 약 7000만 태반 줄기세포에 의하여 조건화한 상층액을 함유한다.

[0201] 투여할 수 있는 약학적 등급의 제품을 마련하기 위하여 조건 배지를 농축할 수 있다. 이를 테면, 물을 제거, 예를 들어, 증발, 동결 건조 등의 방식으로 제거함으로써 조건 배지를 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 이상 농축할 수 있다. 한 특정 태양에서는, 예를 들어 약 7000만 태반 줄기세포가 있는 200 mL 조건 배지를 약 180 mL, 160 mL, 140 mL, 120 mL, 100 mL, 80 mL, 60 mL, 40 mL, 20 mL 또는 그 이하의 부피로 줄일 수 있다. 또한 이 조건 배지를 실질적으로 건조하여, 예를 들어 분말로 만들 수 있다.

6.1.4 태반 줄기세포를 함유하는 매트릭스

[0203] 본 발명은 종양 세포 억제성 태반 줄기세포군이나 종양 억제성 분량의 태반 줄기세포 조건 배지를 함유하는 하이드로겔, 골격(scaffold) 등의 매트릭스를 더 포함한다.

[0204] 본 발명의 태반 줄기세포는 천연 매트릭스, 예를 들어 양막 소재와 같은 태반의 생물질에 파종할 수 있다. 이러한 양막 소재로는 포유류 태반에서 바로 절제된 양막, 고정되거나 열처리된 양막, 실질적으로 건조(즉 <20% H₂O)한 양막, 융모막, 실질적으로 건조한 융모막, 실질적으로 건조한 양막과 융모막 등을 들 수 있다. 태반 줄기세포를 파종할 수 있는 바람직한 태반 생물질은 Hariri의 미국 출원 공보 제2004/0048796호에 기재되어 있다. 이러한 매트릭스, 예를 들어 하이드로겔은 태반 줄기세포 조건 배지 속에 담그거나 이를 이용하여 제조할 수 있다.

[0205] 본 발명의 태반 줄기세포는 예를 들어, 주사 등에 적합한 하이드로겔 용액 속에 혼탁할 수 있다. 이러한 조성물에 적합한 하이드로겔로는 RAD16과 같은 자가 조립(self-assembling) 웨티드를 들 수 있다. 한 실시 태양에서는 상기 세포를 함유하는 하이드로겔 용액을, 예를 들어 틀 속에서 굳혀서 착상(implantation)을 위하여 그 속에 세포를 함유하는 매트릭스를 형성할 수 있다. 이러한 매트릭스 속의 태반 줄기세포를 배양하여 착상 전에 체세포분열로 세포를 증폭할 수도 있다. 상기 하이드로겔은 예를 들어 유기 고분자(천연 또는 합성)로서 공유, 이온 또는 수소 결합을 통하여 가교되어 물을 가둘 수 있는 열린 3차원 격자를 만들므로써 겔을 이룬다. 하이드로겔 형성 물질로는 알긴산과 그 염과 같은 다당류, 웨티드, 폴리포스파진(polyphosphazine)과 폴리아크릴레이트 등 이온결합으로 가교되는 것들 혹은 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체와 같이 각각 온도, pH에 의하여 가교되는 블록 공중합체를 들 수 있다. 몇몇 실시 태양에서 본 발명의 상기 하이드로겔 또는 매트릭스는 생분해성이 있다.

[0206] 본 발명의 몇몇 실시 태양에서는 상기 제형에 제자리(*in situ*) 중합성 겔이 포함된다(예를 들어 미국 특허 출원 공보 제2002/0022676호, Anseth 외, *J. Control Release*, 78(1~3):199~209 (2002) 또는 Wang 외, *Biomaterials*, 24(22):3969~80(2003)을 보라).

[0207] 몇몇 실시 태양에서 이 고분자는 적어도 수용액 속에서 부분적으로 용해성인데, 수용액으로는 물, 완충 염 용액 또는 하전된 측쇄를 가지는 수성 알코올 용액 또는 그의 단일가 이온염을 들 수 있다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측쇄를 가지는 고분자의 예로는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메트아크릴산), 아크릴산과 메트아크릴산의 공중합체, 폴리(아세트산비닐)과 술폰화 폴리스티렌과 같은 술폰화 고분자를 들 수 있다. 산성 측쇄를 가지는 공중합체로서 아크릴산 또는 메트아크릴산과 비닐에테르 모노머 또는 고분자를 반응시켜 얻는 공중합체도 사용할 수 있다. 산성 측쇄의 예로는 카르복시기, 술폰산기, 할로겐화(바람직하게는 플루오르화) 알코올기, 폐놀성 OH기와 산성 OH기가 있다.

[0208] 본 발명의 태반 줄기세포 또는 이들의 공배양물을 3차원 구조 또는 골격에 파종된 다음 생체 내에서 착상(implant)시킬 수 있다. 이러한 구조는 하나 이상의 모든 성장 인자, 세포, 약물 혹은 조직 형성을 촉진시키거나 본 발명의 실시를 다른 방식으로 향상·개선하는 다른 성분과 조합함으로써 착상될 수 있다.

[0209] 본 발명에 쓰일 수 있는 3차원 골격의 예로는 부직 매트, 다공성 포말 또는 자가 조립 웨티드를 들 수 있다. 부직 매트는 글리콜산과 락트산의 합성 흡수성 공중합체(PGA/PLA 등)를 포함하는 섬유(미국 뉴저지주 Somerville의 Ethicon Inc.사의 Vicryl)로부터 만들 수 있다. 포말은 예를 들어 동결건조 또는 냉동진공건조(미국 특허 제6,355,699호 등을 보라)와 같은 공정에 의하여 제조된 폴리(ϵ -카프롤اكتам)/폴리(글리콜

산)(PCL/PGA) 공중합체로 구성된 포말을 3차원 골격으로 쓸 수도 있다.

[0210] 본 발명의 태반 줄기세포는 생리적으로 허용되는 세라믹 소재에 과종하거나 접촉시킬 수 있는데, 이러한 세라믹 소재에는 인산모노-, 인산디-, 인산트리-, 인산알파트리-, 인산베타트리- 와 인산테트라칼슘, 수산화인회석, 불소인회석, 황산칼슘, 플루오르화칼슘, 산화칼슘, 탄산칼슘, 인산마그네슘칼슘, BIOGLASS(등록상표)와 같이 생활성이 있는 유리 및 이들의 혼합물이 포함되지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 현재 시판 중인 생체적합한 다공성 세라믹 소재에는 SURGIBONE(캐나다 CanMedica Corp.의 등록상표), ENDOBON(프랑스 Merck Biomaterial France의 등록상표), CEROS(스위스 Bettlach의 Mathys AG의 등록상표), 그리고 HEALOS(미국 매사추세츠주 Raynham의 DePuy, Inc.의 상표) VITOSS(등록상표), RHAKOSS(상표) 및 CORTOSS(미국 웬실베니아주 Malvern의 Orthovita의 등록상표)와 같은 광물화 콜라겐 뼈 이식 제품들이 포함된다. 이러한 구조는 천연 및/또는 합성 재료의 혼합물, 블렌드 또는 복합물일 수 있다.

[0211] 다른 실시 태양에서 태반 줄기세포는 펠트에 과종하거나 접촉시킬 수 있는데, 이러한 펠트는 예를 들어 PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 블렌드 혹은 히알루론산과 같은 생흡수성 소재로부터 제조한 다중 필라멘트사 (multifilament yarn)로 구성될 수 있다.

[0212] 본 발명의 다른 실시 태양에서는 상기 태반 줄기세포를 복합 구조일 수 있는 포말 골격(foam scaffold)에 과종 할 수 있다. 이러한 포말 골격은 체내에서 수리, 교체, 보강되어야 할 특정 구조 부분의 모양처럼 유용한 형태로 성형할 수 있다. 몇몇 실시 태양에서는 이 구조를 본 발명의 세포를 접종하기 전에 예를 들어 0.1 M 아세트산 처리하고, 이어 폴리리신, PBS 및/또는 콜라겐과 배양하여 세포 부착을 향상시킬 수 있다. 매트릭스의 외부면을 변형하여 세포의 부착과 성장 및 조직의 분화를 향상할 수 있는데, 이러한 변형에는 매트릭스의 혈장 피복 또는 하나 이상의 단백질(예를 들어 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유), 당단백질, 글리코스아미노글리칸(예를 들어 황산헤파린, 황산-4-콘드로이틴, 황산-6-콘드로이틴, 황산데르마탄, 황산케라틴 등), 세포 매트릭스 및/또는 다른 물질의 부가가 있으며, 상기 물질은 젤라틴, 알긴산염, 한천, 아가로스와 식물 겉 등이 있지만 이에 한정 되는 것은 아니다.

[0213] 몇몇 실시 태양에서는 이 3차원 골격을 혈전 형성을 방지하는 물질로 처리하거나, 이 3차원 골격이 그러한 물질을 함유한다. 이러한 물질과 그 처리는 내피 성장, 이동과 세포외 매트릭스 축적을 촉진하고 유지한다. 이러한 물질과 처리법의 예로는 라미닌과 제IV형 콜라겐과 같은 기저막 단백질, EPTFE 등의 합성 물질, PURSPAN(미국 캘리포니아주 버클리의 The Polymer Technonolgy Group Inc.의 상표) 등의 분절된 폴리우레탄요소 실리콘을 들 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 3차원 골격은 또한 헤파린과 같은 항혈전 형성제를 함유할 수 있다. 태반 줄기세포의 과종 전에 상기 골격을 처리하여 표면 전하를 변화(예를 들어 혈장으로 피복)시킬 수 있다.

6.2 복합 요법

[0215] 본 명세서에서 기술하는 태반 줄기세포와 태반 줄기세포 조성물은 하나 이상의 항암제를 포함하는 항암 요법의 일부를 이룰 수 있다. 이러한 항암제는 이 분야에 잘 알려져 있다. 암이 있는 개체에 투여할 수 있는 구체적인 항암제로는 아시비신(acivicin), 아클라비신(aclarubicin), 염산 아코다졸(acodazole), 아크로닌(acronine), 아도젤레신(adozelesin), 알데스류킨(aldesleukin), 알트레타민(altretamine), 암보마이신(ambomycin), 아세트산아메탄트론(ametantrone acetate), 암사크린(amsacrine), 아나스트로졸(anastrozole), 안트라마이신(anthramycin), 아스파라긴 가수분해 효소, 아스페린(asperlin), 아자시티딘(azacitidine), 아제테파(azetepa), 아조토마이신(azotomycin), 바티마스탕(batimastat), 벤조데파(benzodepa), 비칼루타미드(bicalutamide), 염산 비스안트렌(bisantrene hydrochloride), 비스나피드디메실레이트(bisnafide dimesylate), 비겔레신(bizelesin), 황산불레오마이신, 브레퀴나나트륨 (brequinar sodium), 브로피리민(propirimine), 부설판(busulfan), 캐티노마이신(cactinomycin), 칼루스테론(calusterone), 카라세미드(caracemide), 카르베티머(carbetimer), 카르보플라틴(carboplatin), 카르무스틴(carmustine), 염산 카루비신(carubicin hydrochloride), 카르겔레신(carzelesin), 세데핑골(cedefingol), 셀레콕시브(celecoxib (COX-2 억제제)), 클로람부실(chlorambucil), 시클레마이신(cirolemycin), 시스플라틴, 클라드리빈(cladribine), 크리스나톨메실레이트(crisnatol mesylate), 사이클로포스파미드, 시타라빈(cytarabine), 다카르바진(dacarbazine), 닥티노마이신(dactinomycin), 염산 다우노루비신(daunorubicin hydrochloride), 데시타빈(decitabine), 텍소르마플라틴(dexormaplatin), 테자구아닌(dezaguanine), 테자구아닌메실레이트(dezaguanine mesylate), 디아지퀴논(diaziquone), 도세탁셀(docetaxel), 독소루비신(doxorubicin), 염산 독소루비신, 드롤록시펜(droloxifene), 시트르산 드롤록시펜, 프로피온산 드로모스타놀론(dromostanolone propionate), 두아조마이신(duazomycin), 애

다트렉세이트(edatrexate), 염산 에플로미틴(eflomithine hydrochloride), 엘사미트루신(elsamitrucin), 앤로플라틴(enloplatin), 엔프로메이트(enpromate), 에피프로피딘(epipropidine), 염산 에피루비신(epirubicin hydrochloride), 에르불로졸(erbulozole), 염산 에소루비신(esorubicin hydrochloride), 에스트라무스틴(estramustine), 인산 에스트라무스틴 나트륨, 에타니다졸(etanidazole), 에토포시드(etoposide), 인산 에토포시드, 에토프린(etoprime), 염산 파드로졸(fadroazole hydrochloride), 파자라빈(fazarabine), 펜레티니드(fenretinide), 플록스유리딘(floxuridine), 인산 플루다라빈(fludarabine phosphate), 플루오로유라실, 플루오로시타빈(fluorocitabine), 포스퀴돈(fosquidone), 포스트리에신나트륨(fostriecin sodium), 켐시타빈(gemcitabine), 염산 켐시타빈, 히드록시요소, 염산 이다루비신(idarubicin hydrochloride), 이포스파미드(ifosfamide), 일모포신(ilmofosine), 이프로플라틴(iproplatin), 이리노테칸(irinotecan), 염산 이리노테칸, 아세트산란레오티드(lanreotide acetate), 레트로졸(letrozole), 아세트산 류프롤리드(leuprolide acetate), 염산 리아로졸(liarozole hydrochloride), 로메트렉솔 나트륨(lometrexol sodium), 로무스틴(lomustine), 염산 로속산트론(losoxanthrone hydrochloride), 마소프로콜(masoprocol), 마이탄신(maytansine), 염산 메클로레타민(mechlorethamine hydrochloride), 아세트산 메게스트롤(megestrol acetate), 아세트산 멜렌게스트롤(melengestrol acetate), 멜팔란(melphalan), 메노가릴(menogaril), 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 메토트렉세이트 나트륨, 메토프린(metoprine), 메트유레데파(meturedopa), 미틴도미드(mitindomide), 미토카르신(mitocarcin), 미토크로민(mitocromin), 미토길린(mitogillin), 미토말신(mitomalcin), 미토마이신(mitomycin), 미토스퍼(mitosper), 미토탄(mitotane), 염산 미톡산트론(mitoxanthrone hydrochloride), 미코페놀산(mycophenolic acid), 노코다졸, 노갈라마이신(nogalamycin), 오르마플라틴(ormaplatin), 옥시수란(oxisuran), 파클리탁셀, 페가스파르가제(pegaspargase), 펠리오마이신(peliomycin), 펜타무스틴(pentamustine), 황산 폐플로마이신(peplomycin sulfate), 퍼포스파미드(perfosfamide), 피포브로만(pipobroman), 피포술판(piposulfan), 염산 피록산트론(piroxanthrone hydrochloride), 플리카마이신(plicamycin), 플로메스탄(plomestane), 포르피머나트륨(porfimer sodium), 포르피로마이신(porfiromycin), 프레드니무스틴(prednimustine), 염산 프로카르바진(procabazine hydrochloride), 쿠로마이신, 염산 퓨로마이신, 피라조퓨린(pyrazofurin), 리보프린(riboprine), 사핑골(safingol), 염산 사핑골(safingol hydrochloride), 세무스틴(semustine), 시미트라젠(simtrazene), 스파르포세이트나트륨(sparfosate sodium), 스파르소마이신(sparsomycin), 염산 스피로게르마늄(spirogermanium hydrochloride), 스피로무스틴(spiromustine), 스피로플라틴(spiroplatin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 술로페누르(sulofenur), 탈리소마이신(talisomycin), 테코갈란나트륨(tecogalan sodium), 탁소테어(taxotere), 테가푸르(tegafur), 염산 텔록산트론(teloxanthrone hydrochloride), 테모포르핀(tempoerfin), 테니포시드(teniposide), 테록시론(teroxirone), 테스톨락톤(testolactone), 티아미프린(thiamiprime), 티오구아닌, 티오텐파(thiotepa), 티아조푸린(tiazofurin), 티라파자민(tirapazamine), 시트르산 토레미펜(toremifene citrate), 아세트산 트레스톨론(trestolone acetate), 인산 트리시리빈(triciribine phosphate), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 글루쿠론산 트리메트렉세이트, 트립토렐린(triptorelin), 염산 투불로졸(tubulozole hydrochloride), 유라실 머스터드, 유레데파(uredepa), 바프레오티드(vapreotide), 베르테포르핀(verteporfin), 황산 빈블라스틴(vinblastine sulfate), 황산 빈크리스틴(vincristine sulfate), 빈데신(vindesine), 황산 빈데신, 황산 빈에피딘(vinepidine sulfate), 황산 빙글리시네이트(vinglycinate sulfate), 황산 빈류로신(vinleurosine sulfate), 타르타르산 비노렐빈(vinorelbine tartrate), 황산 빈로시딘(vinrosidine sulfate), 황산 빈졸리딘(vinzolidine sulfate), 보로졸(vorozole), 제니플라틴(zeniplatin), 지노스타틴(zinostatin)과 염산 조루비신(zorubicin)이 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0216] 다른 항암제로는 이하를 들 수 있지만, 여기에 한정되지는 아니한다: 20-에피-1,25-디하이드록시비타민 D3, 5-에틴일유라실, 아비라테론(abiraterone), 아클라루비신(aclarubicin), 아실풀벤(acylfulvene), 아데시페놀(adecyphenol), 아도젤레신(adozelesin), 알데스류킨(aldesleukin), ALL-TK 길항제, 알트레타민(altretamine), 암바무스틴(ambamustine), 아미도스(amidox), 아미포스틴(amifostine), 아미노레볼린산(aminolevulinic acid), 암루비신(amrubicin), 암사크린(amsacrine), 아나그렐리드(anagrelide), 아나스트로졸(anastrozole), 안드로그라폴리드(andrographolide), 혈관 신생 억제제, 길항제 D(antagonist D), 길항제 G, 안타렐릭스(antarelix), 항등축화 형태 생성 단백질-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1), 전립선 암종 항안드로겐(antiandrogen, prostatic carcinoma), 항에스토로겐(antiestrogen), 안티네오플라스톤(antineoplaston), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 아피디콜린글리시네이트(aphidicolin glycinate), 세포 자멸사 유전자 조절제, 세포 자멸사 조절제(apoptosis regulators), 아퓨린산(apurinic acid), 아라-CDP-DL-PTBA(arac-CDP-DL-PTBA), 아르기닌 탈아민화효소(arginine deiminase), 아술라크린(asulacrime), 아타메스탄(atamestane), 아트리무스틴

(atrimustine), 악시나스타틴 1(axinastatin 1), 악시나스타틴 2, 악시나스타틴 3, 아자세트론(azasetron), 아자톡신(azatoxin), 아자티로신(azatyrosine), 바카틴 III 유도체(baccatin III derivatives), 발라놀(balanol), 바티마스탯(batimastat), BCR/ABL 길항제, 벤조클로린(benzochlorins), 벤조일스타우로스포린(benzoylstauroporine), 베타락탐 유도체, 베타-알레틴(beta-alethine), 베타클라마이신 B(betaclamycin B), 베톨린산(betulinic acid), bFGF 억제제, 비칼루타미드(bicalutamide), 비스안트렌(bisantrene), 비스아지리딘일스페민(bisaziridinylspermine), 비스나피드(bisnafide), 비스트라텐 A(bistratene A), 비젤레신(bizelesin), 브레플레이트(breflate), 브로피리민(propirimine), 부도티탄(budotitane), 부티오닌술폭시민(buthionine sulfoximine), 칼시포트리올(calcipotriol), 칼포스틴 C(calphostin C), 캄포테신 유도체, 카페시타빈(capecitabine), 카복사미드-아미노-트리아졸(carboxamide-amino-triazole), 카복사미드아미도트리아졸(carboxyamidotriazole), CaRest M3, CARN 700, 연골 유래 억제제(cartilage derived inhibitor), 카르잘레신(carzelesin), 카제인 키나아제 억제제(ICOS), 카스타노스페민(castanospermamine), 세크로핀 B(cecropin B), 세트로렐릭스(cetrorelix), 클로른(chlorins), 클로로퀴녹살린술폰아미드(chloroquinoxaline sulfonamide), 시카프로스트(cicaprost), 시스-포르파린, 클라드리빈(cladribine), 클로미펜 유사체(clomifene analogues), 클로트리마졸(clotrimazole), 콜리스마이신 A(collismycin A), 콜리스마이신 B, 콤브레타스타틴 A4(combretastatin A4), 콤브레타스타틴 유사체, 콘아제닌(conagenin), 크람베시딘 816(crambescidin 816), 크리스나톨(crisnatol), 크립토피신 8(cryptophycin 8), 크립토피신 A 유도체, 큐라신 A(curacin A), 사이클로펜타안트라퀴논(cyclopentanthraquinones), 사이클로플라탐(cycloplatan), 시페마이신(cypemycin), 시타라빈옥포스페이트(cytarabine ocfosfate), 세포질 용해 인자(cytolytic factor), 사이토스타틴(cytostatin), 다클릭시맙(dacliximab), 데시타빈(decitabine), 데하이드로디덴민 B(dehydridodenmin B), 데슬로렐린(deslorelin), 텍사메타손, 텍시포스파미드(dexifofamide), 텍스라족산(dexrazoxane), 텍스베라파밀(dexverapamil), 디아지쿠온(diaziqone), 디템닌 B(didemnin B), 디독스(dodox), 디에틸노르스페민(diethylnor spermine), 디하이드로-5-아자시티딘(dihydro-5-azacytidine), 디하이드로탁솔(dihydrotaxol, 9-), 디옥사마이신(dioxamycin), 디페닐스페로무스틴(diphenyl spiromustine), 도세탁셀(docetaxel), 도코사놀(docosanol), 돌라세트론(dolasetron), 독시플루리딘(doxifluridine), 독소루비신, 드롤록시펜(droloxifene), 드로나비놀(dronabinol), 듀오카르마이신(duocarmycin SA), 엡셀렌(ebselen), 에코무스틴(ecomustine), 에델포신(edelfosine), 에드레콜로맙(edrecolomab), 에플로르미틴(emoflomithine), 엘레멘(elemene), 에미트푸어(emitefur), 에피루비신(epirubicin), 에피스터리드(epristeride), 에스트라무스틴 유사체(estramustine analogue), 에스트로겐 작용제(agonists), 에스트로겐 길항제, 에타니다졸(etanidazole), 인산 에토포시드(etoposide phosphate), 엑세메스탄(exemestane), 과드로졸(fadrozole), 파자라빈(fazarabine), 펜레티니드(fenretinide), 필그라스팀(filgrastim), 핀아스터리드(finasteride), 플라보피리돌(flavopiridol), 플레즈엘라스틴(flezelastine), 플루아스터론(fluasterone), 플루다라빈(fludarabine), 염산플루오로다우노루니신(fluorodaunorunicin hydrochloride), 포르페니멕스(forfenimex), 포르메스탄(formestane), 포스트리에신(fostriecin), 포테무스틴(fotemustine), 가돌리늄텍사피린(gadolinium texaphyrin), 질산갈륨, 갈로시타빈(galocitabine), 가니렐릭스(ganirelix), 젤라틴 분해 효소 억제제, 겨시타빈(gemcitabine), 글루타티온 억제제, 헤프술팜(hepsulfam), 헤레글린(heregulin), 헥사메틸렌비스아세트아미드, 하이퍼리신(hypericin), 이반드론산(ibandronic acid), 이다루비신(idarubicin), 이독시펜(idoxifene), 이드라만تون(idramantone), 일모포신(ilmofosine), 일로마스탈(ilomastat), 이마티닙(imatinib (예를 들어, GLEEVEC(등록상표))), 이미퀴모드(imiquimod)), 면역 자극펩티드, 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제, 인터페론 작용제, 인터페론, 인터류킨, 이오벤구안(iobenguane), 요오도독소루비신(iododoxorubicin), 이포메아놀(ipomeanol, 4-), 이로플락트(iroplact), 이르소글라дин(irsogladine), 이소벤가졸(isobengazole), 이소호모할리콘드린 B(isohomohalicondrin B), 이타세트론(itasetron), 자스플라키놀리드(jasplakinolide), 카할랄리드 F(kahalalide F), 삼아세트산라멜라린-N(lamellarin-N triacetate), 란레오티드(lanreotide), 레이나마이신(leinamycin), 레노그라스팀(lenograstim), 황산렌티난(lentinan sulfate), 렙톨스타틴(leptolstatin), 레트로졸(letrozole), 백혈병 억제인자, 백혈구 알파 인터페론(leukocyte alpha interferon), 류프롤리드(leuprolide)+에스트로겐+프로게스테론, 류프로렐린(leuprorelin), 레바미솔(levamisole), 리아로졸(liarozole), 선형 폴리아민 유사체, 친지질성 이당류 펩티드, 친지질성 백금 화합물, 리소클린아미드 7(lissoclinamide 7), 로바플라틴(lobaplatin), 롬브리신(lombricine), 로메트렉솔(lometrexol), 로니다민(lonidamine), 로속산트론(losoxantrone), 록소리빈(loxoribine), 루르토테칸(lurtotecan), 택사피린루테슘(lutetium texaphyrin), 리소필린(lysophylline), 세포용해성 펩티드(lytic peptides), 마이탄신(maitansine), 만노스타틴 A(mannostatin A), 마리마스탯(marimastat), 마소프로콜(masoprocol), 마스핀(maspin), 마트릴리신(matrilysin) 억제제, 매트릭스 금속단백분해 효소 억제제, 메노가릴(menogaril), 메르바론(merbarone), 메터렐린(meterelin), 메티오닌 분해 효소, 메

토클로프라미드(metoclopramide), MIF 억제제, 미페프리스톤(mifepristone), 밀테포신(miltefosine), 미리모스팀(mirimostim), 미토구아존(mitoguazone), 미토락톨(mitolactol), 미토마이신 유사체(mitomycin analogues), 미토나피드(mitonafide), 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린(mitotoxin fibroblast growth factor-saporin), 미톡산트론(mitoxantrone), 모파로텐(mofarotene), 몰그라모스팀(molgramostim), 에르비툭스(Eribitux, 사람 융모막 생식샘 자극 호르몬), 단일인산 지질 A+마이코박테리아 세포벽 골격(monophosphoryl lipid A+myobacterium cell wall sk), 모피다몰(mopidamol), 머스터드 항암제, 미카페록사이드 B(mycaperoxide B), 마이코박테리아 세포벽 추출물, 미리아포론(myriaporone), N-아세틸디날린(N-acetyldinaline), N-치환 벤즈아미드, 나파렐린(nafarelin), 나그레스틴(nagrestin), 날록손+펜타조신(naloxone+pentazocine), 나파빈(napavine), 나프테르핀(naphterpin), 나르토그라스틴(nartograstim), 네다플라틴(nedaplatin), 네모루비신(nemorubicin), 네리드론산(neridronic acid), 닐루타미드(nilutamide), 니사마이신(nisamycin), 산화질소 조절제(modulators), 산화질소 항산화제, 니트룰린(nitruulin), 오블리머센(oblimersen (GENASENSE(등록상표))), O^6 -벤질구아닌, 옥트레오티드(octreotide), 오키세논(okicenone), 올리고뉴클레오티드, 오나프리스톤(onapristone), 온단세트론(ondansetron), 오라신(oracine), 경구 사이토kin 유도제, 오르마플라틴(ormaplatin), 오사터론(osaterone), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 옥사유노마이신(oxaunomycin), 파클리탁셀(paclitaxel), 파클리탁셀 유사체, 파클리탁셀 유도체(paclitaxel derivatives), 팔라우아민(palaumine), 팔미토일리족신(palmitoylrhizoxin), 팔미드론산(pamidronic acid), 파낙시트리올(panaxytriol), 파노미펜(panomifene), 파라박틴(parabactin), 파젤립틴(pazelliptine), 페가스파르가제(pegaspargase), 펠데신(pledessine), 펜토산폴리황산나트륨(pentosan polysulfate sodium), 펜토스타틴(pentostatin), 펜트로졸(pentrozole), 퍼플루브론(perflubron), 퍼포스파미드(perfosfamide), 퍼릴릴알코올(perillyl alcohol), 펜아지노마이신(phenazinomycin), 페닐아세트산, 인산 분해 효소 억제제, 피시바닐(picibanil), 염산필로카르핀(pilocarpine hydrochloride), 피라루비신(pirarubicin), 피리트렉심(piritrexim), 플라세틴 A(placetin A), 플라세틴 B, 플라스미노겐 활성화제 억제제, 백금 착물, 백금 화합물, 백금-트리아민 착물, 포르피며 나트륨(porfimer sodium), 포르피로마이신(porfiromycin), 프레드니손(prednisone), 프로필비스아크리돈(propyl bis-acridone), 프로스타글란딘 J2, 프로테아좀 억제제, 단백질 A-기반 면역 조절제, 단백질 키나아제 C 억제제, 미세조류 단백질 키나아제 C 억제제, 미세조류(microalgal), 단백질 티로신 인산 분해효소 억제제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라아제 억제제, 퍼퓨린(purpurins), 파라졸로아크리딘(pyrazoloacridine), 파리독신화 혜모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체(conjugate), raf 길항제, 랄티트렉세드(raltitrexed), 라모세트론(ramosetron), ras 파네실 단백질 전달효소 억제제, ras 억제제, ras-GAP 억제제, 탈메틸화레텔립틴(retelliptine demethylated), 에티드론산레늄 186(rhenium Re 186 etidronate), 리죽신(rhizoxin), 리보자임, RII 레티나미드(retinamide), 로히투킨(rohitukine), 로무르티드(romurtide), 로퀴니멕스(roquinimex), 루비기논 B1(rubiginone B1), 루복실(ruboxylin), 사핑골(safingol), 사인토핀(saintopin), 사르CNU(SarCNU), 사르코피톨 A(sarcophytol A), 사르그라모스팀(sargramostim), Sdi 1 모의 물질(Sdi 1 mimetics), 세무스틴(semustine), 노화 유래 억제제 1(senescence derived inhibitor 1), 센스 올리고뉴클레오티드, 신호 전달 억제제, 시조퓨란(sizofuran), 소부족산(sobuzoxane), 보로캅트산나트륨(sodium borocaptate), 페닐아세트산나트륨, 솔베롤(solverol), 소마토메딘 결합성 단백질(somatomedin binding protein), 소너민(sonermin), 스파르포스산(sparfuside), 스피카마이신 D(spacamycin D), 스피로무스틴(spiromustine), 스플레노펜틴(splenopentin), 스폰지스타틴 1(spongistatin 1), 스쿠알라민(squalamine), 스티피아미드(stipamide), 스트로멜리신 억제제(stromelysin inhibitors), 술피노신(sulfinosine), 초활성 혈관 작용성 장 펩티드 길항제(superactive vasoactive intestinal peptide antagonist), 수라디스타(suradista), 수라민(suramin), 스와인소닌(swainsonine), 탈리무스틴(tallimustine), 타목시펜메트아이오다이드(tamoxifen methiodide), 타우로무스틴(tauromustine), 타자로텐(tazarotene), 테코갈란나트륨(tecogalan sodium), 테가푸어(tegafur), 텔루르아피릴륨(tellurapyrylium), 텔로머라제 억제제, 테모포르핀.temoporfin), 테니포시드(teniposide), 테트라클로로데카옥시드(tetrachlorodecaoxide), 테트라조민(tetrazomine), 탈리블라스틴(thaliblastine), 티오코랄린(thiocoraline), 트롬보포이에틴, 트롬보포이에틴 모의 물질, 티말파신(thymalfasin), 티모포이에틴 수용체 작용제(thymopoietin receptor agonist), 티모트리난(thymotrinan), 갑상선 자극 호르몬, 에티오퍼퓨린 에틸주석(tin ethyl etiopurpurin), 티라파자민(tirapazamine), 이염화티타노센(titanocene bichloride), 톱센틴(topsentin), 토레미펜(toremifene), 유전 정보 번역 억제제, 트레티노인(tretinoin), 트리아세틸유리딘, 트리시리빈(triciridine), 트리메트렉세이트(trimetrexate), 트립토렐린(triptorelin), 트로피세트론(tropisetron), 투로스테리드(turosteride), 티로신 키나아제 억제제, 티르포스틴(tyrphostins), UBC 억제제, 유베니멕스(ubenimex), 비뇨생식줄 유래 성장 억제 인자(urogenital sinus-derived growth inhibitory factor), 유로키나

아제(urokinase) 수용체 길항제, 바프레오티드(vapreotide), 바리올린 B(variolin B), 벨라레솔(velaresol), 베라민(veramine), 베르딘(verdins), 베르테포르핀(verteporfin), 비노렐빈(vinorelbine), 빈잘틴(vinxaltine), 비탁신(vitaxin), 보로졸(vorozole), 자노테론(zanoterone), 제니플라틴, 질라스코롭(zilascor), 지노스타틴 스티말라머(zinostatin stimalamer).

[0217] 6.3 분석 방법

본 발명의 태반 줄기세포는 태반 줄기세포의 종양 세포 증식 억제능을 향상시키는 화합물 또는 조성물을 동정하는 분석에 쓰일 수 있다. 바람직하게, 이러한 분석은 상기 화합물 또는 조성물이 없이도 태반 줄기세포에 의하여 그 증식을 억제할 수 있는 유형의 암을 대상으로 사용한다.

한 바람직한 실시 태양에서는 본 발명의 태반 줄기세포를 시험 화합물과 종양 세포, 예를 종양 세포주에 혼합하고, 태반 줄기세포가 상기 종양 세포에 미치는 효과, 예를 들어 상기 화합물의 존재하에 또는 부재하의 효과를 측정한다. 시험 화합물이 존재할 때 종양 세포의 증식이 그 화합물이 없을 때보다 검출 가능한 정도로 줄어들다면 그 시험 화합물은 태반 줄기세포의 종양 세포 증식 억제능을 향상시킨다. 예를 들어 한 실시 태양에서 본 발명은 태반 세포의 종양 세포 억제능을 향상시키는 화합물을 동정하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 화합물의 존재 하에서 복수의 첫째 줄기세포와 복수의 둘째 줄기세포를 종양 세포 증식을 허용하는 조건 속에서 접촉시키는 단계를 포함한다. 여기서 상기 화합물과 접촉하지 못한 복수의 종양 세포의 경우와 비교하여 상기 화합물이 종양 세포 증식에 검출 가능한 변화를 일으키면 상기 화합물을 태반 줄기세포에 의한 종양 억제 효과를 향상시키는 화합물로 동정한다. 상기 복수의 첫째와 복수의 둘째 줄기세포는 세포 수가 같을 수도, 다를 수도 있다. 어느 한 태양에서, 상기 종양 세포는 생검에서 얻은 종양 세포이다. 다른 특정 태양에서, 상기 종양 세포는 종양 세포주의 세포이다.

아울러 본 발명은 화합물 모음(panel)이나 집합 중에서 태반 줄기세포에 의한 종양 세포 증식 억제를 가장 잘 향상시키는 화합물 또는 복수의 화합물을 동정하는 방법을 제공한다. 다양한 암들은 서로 다른 유전적, 생화학적 근원과 특성이 있고, 병인을 달리하기 때문에 서로 다른 화합물은 태반 줄기세포의 종양 세포 억제능을 향상시키는데 있어서 그 효과가 더 크거나 더 적을 수 있다. 예를 들어 상기 화합물 모음이나 집합은 앞서 6.2 단원에 열거한 항암 또는 항신생(antineoplastic) 화합물 모음 또는 집합일 수 있는데, 이들로 제한되는 것은 아니다. 그러한 실시 태양에서는, 예를 들어 암을 앓고 있는 개체로부터 얻은 종양 세포를 태반 줄기세포의 존재 하에서 어떤 화합물 모음에 대하여 시험하여, 그 개체를 치료하는데 가장 적절한 하나의 또는 복수의 상기 항암 또는 항신생 화합물을 동정할 수 있다.

따라서 한 실시 태양에서, 본 발명은 여러 화합물 중에서 하나의 화합물을 선택하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 여러 화합물 속의 화합물마다 복수의 첫째 줄기세포를, 상기 여러 화합물 중 어느 한 화합물의 존재 하에, 종양 세포 증식을 허용하는 조건에서 복수의 둘째 줄기세포와 접촉시키는 단계 및 상기 여러 화합물 중에서 종양 세포 증식 억제 정도를 상기 화합물과 접촉하지 못한 복수의 종양 세포의 경우와 비교했을 때, 미리 정해진 어느 기준보다 더 높은 수준으로 향상시키는 하나 이상의 상기 화합물을 동정하는 단계를 포함한다. 이러한 미리 정해진 기준은 이를 테면, 상기 여러 화합물 중에서 가장 높은 정도의 향상 효과를 보이는 하나의 화합물, 상기 여러 화합물 가장 높은 향상 효과를 보이는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 화합물, 상기 여러 화합물 중 종양 세포 억제 효과를 향상시키는 모든 화합물 등일 수 있다. 바람직하게는 상기 방법이 암을 앓고 있는 상기 개체에 투여할 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 화합물을 선택하는데 쓰인다.

실시예

[0241] 1. 실시예 1: 태반 줄기세포의 배양

분만 후의 포유류 태반으로부터 관류 혹은 효소 소화 등의 물리적 파괴에 의하여 태반 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 세포를 60% DMEM-LG(Gibco), 40% MCDB-201(Sigma), 2% 소 태아 혈청(FCS) (Hyclone Laboratories), 1×인슐린-트랜스페린-셀렌(selenium, ITS), 1×리놀렌산-소 혈청 알부민(LA-BSA), 10^{-9} M 텍사메타손(Sigma), 10^{-4} M 아스코르브산 2-인산(Sigma), 표피 성장 인자(EGF) 10 ng/mL(R&D Systems), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF-BB) 10 ng/mL(R&D Systems)와 100 단위 penicillin/1000 단위 스트렙토마이신을 함유하는 배양 배지 속에서 배양한다.

이 세포들이 배양되는 배양 플라스크는 다음과 같이 마련할 수 있다. 피브로네틴(FN) 피복 T75 플라스크는 5

ng/mL 사람 피브로넥틴(Sigma F0895)을 함유하는 PBS 5 mL를 이 플라스크에 가하여 마련할 수 있다. 이 피브로넥틴 용액을 담은 플라스크를 37°C에서 30 분 동안 방치한다. 이어서 세포 배양 전 이 피브로넥틴 용액을 떨어낸다. 이러한 처리 이후 플라스크를 건조할 필요는 없다. 혹은 이 플라스크를 4°C에서 하룻밤 동안 또는 더 오랜 동안 피브로넥틴 용액과 접촉시킬 수 있다. 세포 배양 전 이 플라스크를 덥히고 피브로넥틴 용액을 떨어낸다.

[0244] 관류에 의한 태반 줄기세포의 분리

태반 관류물로부터 태반 줄기세포 배양을 확립하는 절차는 다음과 같다. 피콜 농도구배에서 얻은 세포를 상기와 같이 하여 얻은 피브로넥틴 피복 T75 플라스크에 플라스크 당 $50\sim100 \times 10^6$ 개 세포를 15 mL 배양 배지 속에 담아 파종한다. 5 개에서 10 개의 플라스크에 파종하는 것이 전형적인 경우이다. 이 플라스크를 12~18 시간 동안 37°C에서 배양하여 세포가 부착하도록 한다. 따뜻한 PBS 10 mL를 각 플라스크에 가하여 혼탁된 세포를 제거하고 천천히 섞어 준다. 이 배지 15 mL를 떨어낸 다음 새 배양 배지 15 mL를 가한다. 모든 배지는 배양 시작 후 3~4일 후에 갈아준다. 그 다음 배지 교체에서는 배지의 50% 또는 7.5 mL를 떨어내어 갈아준다.

대략 제12일째에 이 세포 배양액을 현미경으로 확인하여 부착 세포 콜로니가 성장했는지 점검한다. 세포 배양이 약 80% 세포 합류 수준, 전형적으로는 배양 시작 후 제13일 내지 제18일째에 이르면 부착 세포를 트립신 소화에 의하여 수화한다. 이 1차 배양으로부터 수화한 세포를 제0 계대(zero)로 일컫는다.

[0247] 물리적 과피와 효소 소화에 의한 태반 줄기세포의 분리

소화된 태반 조직으로부터 태반 줄기세포 배양을 확립하는 아래와 같다. 관류된 태반을 무균 종이 시트 위에 모체 쪽을 위로 하여 올려 놓는다. 모체 쪽 태반 표면층의 약 0.5 cm를 칼날로 제거하고, 그 칼날을 이용하여 대략 $1 \times 2 \times 1$ cm 크기의 태반 조직 절편을 떼어낸다. 이 태반 조직을 다시 잘게 썰어 약 1 mm 크기 조각으로 나눈다. 이들 조각을 50 mL 팔콘(Falcon) 튜브에 모으고 콜라겐 분해 효소 IA(2 mg/mL, Sigma)로 30분 동안 소화한 다음 트립신-EDTA (0.25%, GIBCO BRL)로 37°C 물 중탕에서 10분 동안 처리한다. 이렇게 얻은 용액을 400 g에서 10분 동안 실온 원심분리하여 효소 소화 용액을 떨어낸다. 이 펠렛으로부터 약 10배 부피의 PBS 혼탁액(예를 들어 5 mL 펠렛은 45 mL PBS에 혼탁하게 된다)을 얻은 다음, 그 튜브를 400 g에서 10분 동안 실온 원심분리한다. 이 조직/세포 펠렛을 130 mL의 배양 배지 속에 재현탁한 다음, 피브로넥틴 피복 T75 플라스크마다 13 mL의 세포를 파종한다. 세포를 37°C의 5% 이산화탄소 농도 가습 공기 속에서 배양한다. 이 단계에서는 선택적으로 태반 줄기세포를 냉동보존할 수 있다.

[0249] 태반 줄기세포의 계대 배양과 증폭

37°C 물 중탕으로 냉동보존된 세포를 급히 해동한다. 따뜻한 배지 10 mL를 이용하여 냉동 비알로부터 태반 줄기세포를 곧바로 꺼내어 15 mL 짜리 무균 튜브로 옮긴다. 이 세포를 400 g에서 10분 동안 실온 원심분리한다. 이 세포를 피펫을 통하여 10 mL의 따뜻한 배지 속에 조심스레 혼탁하고, 트리판블루 배제 실험으로 세포 생존률을 측정한다. 상술한 대로 준비한 피브로넥틴 피복 플라스크에 6000~7000 세포/cm²의 비율(T-75 플라스크 당 약 5×10^5 세포)로 세포를 파종한다. 이 세포를 37°C로 5% 이산화탄소와 90% 습도 하에서 배양한다. 세포가 75~85% 세포합류 수준에 이르면 사용된 배지 전부를 플라스크에서 무균 제거한 다음 버린다. 0.25% 트립신 /EDTA(w/v) 용액 3 mL를 가하여 세포층을 덮고, 이 세포를 5분 동안 37°C, 5% 이산화탄소와 90% 습도 하에서 배양한다. 이 플라스크를 한 두 차례 가볍게 전드려 세포 탈착을 돋는다. 95%를 넘는 수의 세포가 탈착하고 구형이 되면, 각 T-75 플라스크에 따뜻한 배양 배지 7 mL를 가하고 이 용액을 세포층 표면에 몇 차례 피펫질하여 분산시킨다.

전술한 것처럼 세포 수를 세고 생존률을 측정한 다음, 이 세포를 분당 회전수 1000으로 실온에서 5분 동안 원심분리한다. 하나의 T-75 플라스크에서 나온 세포 펠렛을 배양 배지 속에 부드럽게 혼탁하고 이를 두 개의 피브로넥틴 피복 T-75 플라스크 표면에 골고루 나눠 펌으로써 세포를 계대한다.

상기 방법을 이용하여 CD105, CD117, CD33, CD73, CD29, CD44, CD10, CD90과 CD133을 발현하면서 CD34 또는 CD45를 발현하지 않는 부착성 태반 줄기세포군들을 동정하였다. 이 세포는 HLA-ABC 및/또는 HLA-DR를 발현할 수도 않을 수도 있다.

2. 태반 구조로부터 태반 줄기세포의 분리

2.1 실험 재료와 방법

[0255]

2.1.1 관심 대상 표현형의 분리

[0256]

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

[0257]

2.1.2 세포 생존률 평가와 세포 수 세기

[0258]

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

[0259]

2.1.3 세포 표면 표지의 특성 분석

[0260]

HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺인 세포를 특성 분석을 위하여 선별하였다. 이 표현형을 갖춘 세포를 동정하고, 수를 센 다음, 두 대의 Becton-Dickinson사 흐름세포 측정 장치(flow cytometer)인 FACSCalibur와 FACS Aria(미국 캘리포니아주 산호세 Becton-Dickinson)로 특성을 분석하였다. 이들 다양한 태반 세포를 세포 1백만 개당 약 10 μL 항체의 비율로 교반기 위에서 30 분 동안 실온에서 염색하였다. 아래 나타낸 항-사람 항체를 사용하였다: 이소티오시안산플루오레사인 결합(FITC-conjugated) 단일 클론항체로서, HLA-G(미국 노스캐롤라이나주 Raleigh의 Serotec), CD10(미국 캘리포니아주 산호세의 BD Immunocytometry Systems), CD44(미국 캘리포니아주 산호세의 BD Biosciences Pharmingen)와 CD105(미국 미네소타주 미니애폴리스의 R&D Systems Inc.)에 대한 항체), (피코에리드린(PE) 결합 단일클론 항체로서, CD44, CD200, CD117 및 CD13에 대한 항체(BD Biosciences Pharmingen)), (피코에리드린-CY5(PE Cy5) 결합 스트렙아비딘과 단일 클론항체로서 CD117(BD Biosciences Pharmingen)에 대한 항체), (피코에리드린-Cy7(PE Cy 7) 결합 단일클론 항체로서 CD33과 CD10에 대한 항체(BD Biosciences Pharmingen)), (알로피코시아닌(APC) 결합 스트렙아비딘과 단일클론 항체로서 CD38에 대한 것(BD Biosciences Pharmingen)), (그리고 바이오틴화 CD90 (BD Biosciences Pharmingen)). 배양 후, 이 세포를 한 번 헹구어 주어 결합하지 않은 항체를 씻어내고, 하룻밤 동안 4°C에서 4% 과라포름알데히드(미국 오하이오주 클리블랜드의 USB)로 고정하였다. 다음 날, 이 세포를 두 차례 헹구어 준 다음, 30 μm 필터로 여과하였다. 이어서 세포를 흐름 세포측정 장치에 넣고 실험하였다.

[0261]

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

[0262]

2.1.4 세포 분류와 배양

[0263]

한 집단의 태반 세포(관류물, 양막 또는 융모막 유래)를 7-아미노-악티노마이신 D(7AAD, BD Biosciences Pharmingen)와 관심 대상 표현형에 특이적인 단일클론 항체로 염색하였다. 이 세포를 세포 백만 개 당 항체 10 μL 의 비율로 염색하고 실온에서 30분 동안 교반기 위에서 배양하였다. 이어서 BD FACS Aria를 이용하여 이들 세포 중 관심 대상 표현형을 발현하는 살아 있는 세포를 분류하고 배지에 고루 빌라주었다. 분류(sorted, 관심 대상 세포군)와 "전체"(all, 분류되지 않은 세포) 태반 세포군을 배지에 빌라주어 비교하였다. 세포는 피브로넥틴(Sigma-Aldrich) 피복 96 웰 플레이트에 표 1에 나타낸 세포 밀도(세포/ cm^2)로 빌라주었다. 이 세포 밀도, 그리고 해당 세포 유형을 이중으로 혹은 삼중으로 배지에 빌라주는지 여부는 해당 관심 표현형을 발현하는 세포의 수에 따라 결정하였다.

표 1

[0264]

배지에 바른 세포의 밀도

96 웰 플레이트 배양 배지 표면에 발라준 세포의 밀도			
조건	분류(sorted)	전체(all)	전체 최고 밀도
세포원	A		
제1집합	$40.6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$40.6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$93.8 \times 10^3 / \text{cm}^2$
제2집합	$40.6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$40.6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$93.8 \times 10^3 / \text{cm}^2$
제3집합	$40.6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$40.6 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$93.8 \times 10^3 / \text{cm}^2$
세포원	B		
제1집합	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$62.5 \times 10^3 / \text{cm}^2$
제2집합	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$62.5 \times 10^3 / \text{cm}^2$
세포원	C		
제1집합	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$62.5 \times 10^3 / \text{cm}^2$
제2집합	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$6.3 \times 10^3 / \text{cm}^2$	$62.5 \times 10^3 / \text{cm}^2$

[0265]

완전 배지(60% DMEM-LG (Gibco)와 40% MCDB-201(Sigma)), (2% 소 태아 혈청(Hyclone Labs.)), (1×인슐린-트랜스페린-셀렌(ITS)), (1×리놀렌산-소 혈청 알부민(LA-BSA)), (10^{-9} M 텍사메타손(Sigma)), (10^{-4} M 아스코르브산 2-인산(Sigma)), (표피 성장 인자 10 ng/mL (R&D Systems)), (혈소판 유래 성장 인자(PDGF-BB) 10 ng/mL (R&D Systems))를 상기 96 웰플레이트의 각 웰에 가하고 이 플레이트를 5% CO_2 /37°C 배양기 속에 놓았다. 제7일에 완전 배지 100 μL 를 각 웰에 부가하였다. 이 96 웰 플레이트를 약 2주 동안 감시하고, 제12일에 배양물의 최종 평가를 마무리하였다.

[0266]

2.1.5 데이터 분석

[0267]

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

[0268]

2.2 결과

2.2.1 세포 생존률

[0269]

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

[0270]

2.2.2 세포 계량

[0271]

태반에서 유래한 5 종류의 서로 다른 세포군을 분석하여 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 수를 결정하였다. BD FACSCalibur 데이터 분석 결과, 양막, 판류물 그리고 용모막에서 이들 세포의 총수가 가장 많았다. 각각 30.72 ± 21.80 세포 ($n=4$, SEM=10.90), 26.92 ± 22.56 세포 ($n=3$, SEM=13.02)와 18.39 ± 6.44 세포 ($n=2$, SEM=4.55)였다. 양막-용모막판과 텃줄은 이러한 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 총수가 가장 적었다. 각각 4.72 ± 4.16 세포($n=3$, SEM=2.40)와 3.94 ± 2.58 세포($n=3$, SEM=1.49)였다.

[0272]

마찬가지로 이러한 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 총수를 백분율 분석하자, 양막과 태반 판류물이 이러한 표현형을 발현하는 세포를 가장 높은 비율로 함유하였다(각각 $0.0319\% \pm 0.0202\%$ ($n=4$, SEM=0.0101)와 $0.0269\% \pm 0.0226\%$ ($n=3$, SEM=0.0130)였다. 도 2 참조). 비록 텃줄은 이러한 관심 대상 표현형을 발현하는 세포를 조금밖

에 가지고 있지 않았지만(도 2), 이 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 비율은 세번째로 높았다. $0.020 \pm 0.0226\%$ (n=3, SEM=0.0131)(도 2). 융모막과 양막-융모막판은 이 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 비율이 가장 낮았는데, 각각 $0.0184 \pm 0.0064\%$ (n=2, SEM=0.0046)와 $0.0177 \pm 0.0173\%$ (n=3, SEM=0.010)이었다(도 2).

[0274] BD FACS Aria 데이터에서도 양막, 관류물과 융모막이 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포를 나머지 세포원보다 더 많이 제공하는 것으로 나타나 상기 BD FACSCalibur 분석 결과와 부합하였다. 양막, 관류물, 융모막에서 관심 대상 표현형을 발현하는 세포 총수의 평균은 각각 126.47 ± 55.61 세포(n=15, SEM=14.36), 81.65 ± 34.64 세포(n=20, SEM=7.75)와 51.47 ± 32.41 세포(n=15, SEM=8.37)였다. 양막-융모막판과 텃줄은 이 관심 대상 표현형을 발현하는 세포의 비율이 가장 낮았는데, 각각 44.89 ± 37.43 세포(n=9, SEM=12.48)와 11.00 ± 4.03 세포(n=9, SEM=1.34)였다.

[0275] BD FACS Aria 데이터는 B와 A 세포원이 가장 높은 비율로 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포를 함유하며, 각각 $0.1523 \pm 0.0227\%$ (n=15, SEM=0.0059)와 $0.0929 \pm 0.0419\%$ (n=20, SEM=0.0094)임을 나타내었다(FIG. 3). D 세포원은 관심 대상 표현형을 발현하는 비율이 세번째로 높았는데, $0.0632 \pm 0.0333\%$ (n=9, SEM=0.0111)였다(도 3). C 와 E 세포원은 관심 대상 표현형을 발현하는 비율이 가장 낮았는데, 각각 $0.0623 \pm 0.0249\%$ (n=15, SEM=0.0064)와 $0.0457 \pm 0.0055\%$ (n=9, SEM=0.0018)이었다(도 3).

[0276] 각 세포원으로부터 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포들을 동정하고 그 수를 계량한 다음에, 나아가 세포가 세포 표면 표지 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200과 CD105를 발현하는지 여부를 분석하고 특성 파악하였다.

2.2.3 태반 관류물 유래 세포

[0277] 관류물 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105와 CD13 표지에 대하여 양성이었다(도 4). 관류물 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 $37.15\% \pm 38.55\%$ (n=4, SEM=19.28)가 HLA-G 발현), (세포 중 $36.37\% \pm 21.98\%$ (n=7, SEM=8.31)가 CD33 발현), (세포 중 $39.39\% \pm 39.91\%$ (n=4, SEM=19.96)가 CD117 발현), (세포 중 $54.97\% \pm 33.08\%$ (n=4, SEM=16.54)가 CD10 발현), (세포 중 $36.79\% \pm 11.42\%$ (n=4, SEM=5.71)가 CD44 발현), (세포 중 $41.83\% \pm 19.42\%$ (n=3, SEM=11.21)가 CD200 발현), (세포 중 $74.25\% \pm 26.74\%$ (n=3, SEM=15.44)가 CD90 발현), (세포 중 $35.10\% \pm 23.10\%$ (n=3, SEM=13.34)가 CD38 발현), (세포 중 $22.87\% \pm 6.87\%$ (n=3, SEM=3.97)가 CD105 발현), (세포 중 $25.49\% \pm 9.84\%$ (n=3, SEM=5.68)가 CD13 발현.

2.2.4 양막 유래 세포

[0278] 양막 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105와 CD13에 대하여 양성이었다(도 5). 양막 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 $57.27\% \pm 41.11\%$ (n=3, SEM=23.73)가 HLA-G 발현), (세포 중 $16.23\% \pm 15.81\%$ (n=6, SEM=6.46)가 CD33 발현), (세포 중 $62.32\% \pm 37.89\%$ (n=3, SEM=21.87)가 CD117 발현), (세포 중 $9.71\% \pm 13.73\%$ (n=3, SEM=7.92)가 CD10 발현), (세포 중 $27.03\% \pm 22.65\%$ (n=3, SEM=13.08)가 CD44 발현), (세포 중 $6.42\% \pm 0.88\%$ (n=2, SEM=0.62)가 CD200 발현), (세포 중 $57.61\% \pm 22.10\%$ (n=2, SEM=15.63)가 CD90 발현), (세포 중 $63.76\% \pm 4.40\%$ (n=2, SEM=3.11)가 CD38 발현), (세포 중 $20.27\% \pm 5.88\%$ (n=2, SEM=4.16)가 CD105 발현), (세포 중 $54.37\% \pm 13.29\%$ (n=2, SEM=9.40)가 CD13 발현.

2.2.5 융모막 유래 세포

[0279] 융모막 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38와 CD13에 대하여 양성이었지만 CD33와 CD105의 발현은 가변적이었다(도 6). 융모막 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 $53.25\% \pm 32.87\%$ (n=3, SEM=18.98)가 HLA-G 발현), (세포 중 $15.44\% \pm 11.17\%$ (n=6, SEM=4.56)가 CD33 발현), (세포 중 $70.76\% \pm 11.87\%$ (n=3, SEM=6.86)가 CD117 발현), (세포 중 $35.84\% \pm 25.96\%$ (n=3, SEM=14.99)가 CD10 발현), (세포 중 $28.76\% \pm 6.09\%$ (n=3, SEM=3.52)가 CD44 발현), (세포 중 $29.20\% \pm 9.47\%$ (n=2, SEM=6.70)가 CD200 발현), (세포 중 $54.88\% \pm 0.17\%$ (n=2, SEM=0.12)가 CD90 발현), (세포 중 $68.63\% \pm 44.37\%$ (n=2, SEM=31.37)가 CD38 발현), (세포 중 $23.81\% \pm 33.67\%$ (n=2, SEM=23.81)가 CD105 발현), (세포 중 $53.16\% \pm 62.70\%$ (n=2, SEM=44.34)가 CD13 발현.

2.2.6 양막-융모막판 태반 세포

[0280] 양막-융모막판 유래 세포는 일관되게 HLA-G, CD33, CD117, CD10, CD44, CD200, CD90, CD38, CD105와 CD13에 대하여 양성이었다(도 7). 양막-융모막판 유래 세포에서 각 표지의 평균 발현은 다음과 같다: 세포 중 $53.25\% \pm 32.87\%$ (n=3, SEM=18.98)가 HLA-G 발현), (세포 중 $15.44\% \pm 11.17\%$ (n=6, SEM=4.56)가 CD33 발현), (세포 중 $70.76\% \pm 11.87\%$ (n=3, SEM=6.86)가 CD117 발현), (세포 중 $35.84\% \pm 25.96\%$ (n=3, SEM=14.99)가 CD10 발현), (세포 중 $28.76\% \pm 6.09\%$ (n=3, SEM=3.52)가 CD44 발현), (세포 중 $29.20\% \pm 9.47\%$ (n=2, SEM=6.70)가 CD200 발현), (세포 중 $54.88\% \pm 0.17\%$ (n=2, SEM=0.12)가 CD90 발현), (세포 중 $68.63\% \pm 44.37\%$ (n=2, SEM=31.37)가 CD38 발현), (세포 중 $23.81\% \pm 33.67\%$ (n=2, SEM=23.81)가 CD105 발현), (세포 중 $53.16\% \pm 62.70\%$ (n=2, SEM=44.34)가 CD13 발현.

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

[0285]

2.2.7 탯줄 유래 세포

[0286]

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

[0287]

모든 표지 발현의 평균을 정리한 결과는 도 9에 나타내었다.

[0288]

2.2.8 BD FACS Aria 분류 결과 보고서

[0289]

HLA ABC, CD45, CD34와 CD133을 가장 높은 비율로 발현하는 세 가지 서로 다른 세포군(관류물, 양막과 융모막 유래 세포)를 7AAD와 이들 표지에 대한 항체들로 염색하였다. 이 세 종류의 세포군에 대하여 관심 대상 표현형을 발현하는 세포들을 선택하여 세포 분류하였다. BD FACS Aria 세포 분류 결과는 표 2에 나타나 있다.

표 2

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

[0291]

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

[0292]

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

[0293]

융모막 유래 분류 세포는 배지에 6,300 세포/cm²로 발라주었는데, 작고, 등근 비부착 세포를 낳았다. 융모막 유래 비분류 세포는 밀도를 6,300 세포/cm²로 하여 배지에 발라주었는데, 작고, 등근 비부착 세포를 낳았다. 융모막 유래 비분류 세포 중 밀도를 62,500 세포/cm²로 하여 발라준 것은 작고 등근 비부착 세포를 낳았다.

[0294]

다른 실험에서, 초기에 등글고 비부착성이던 전술한 세포군들은 후속 배양하자 조직 배양면에 부착하였고, 특징적인 섬유모세포 형태를 띠었다. 전형적으로, 이들 부착세포는 CD117을 발현하지 않았고, 일관되게 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺이고 CD200⁺이었다.

3. 실시예 3 : 태반 줄기세포의 분화

[0295] 부착성 태반 줄기세포를 몇 가지 서로 세포 계통으로 분화하였다. 부착 태반 줄기세포는 양막, 융모막, 태반엽 또는 이들의 조합을 포함하는 태반 내 해부 자리의 조직을 물리적으로 파괴하여 태반에서 얻었고, 제대 줄기세포는 제대 조직을 물리적으로 파괴하여 얻었다.

[0296] 태반 줄기세포와 제대 줄기세포를 낮은 농도의 소 태아 혈청과 제한적인 분량의 성장 인자가 들어 있는 배지 속에서 수립하였다. 흐름 세포 측정 결과, 전형적인 태반 줄기세포는 $CD200^+ CD105^+ CD73^+ CD34^- CD45^-$ 표현형을 % 비율로 나타냈다. 태반 줄기세포는 지방세포, 연골세포와 골세포 계통으로 분화한 것으로 밝혀졌다.

[0297] IBMX, 인슐린, 텍사메타손과 인도메타신이 함유된 유도 배지(induction medium) 속에서 태반 줄기세포는 3 내지 5 주만에 지방이 축적된 지방세포로 바뀌었다. 골 형성 유도 배양 조건에서는 태반 줄기세포가 골 결절(bone nodule)을 형성하고 세포외 매트릭스에 칼슘 침착을 일으킨 것으로 드러났다. 태반 유래 부착 세포(placenta-derived adherent cell, PDAC)의 연골 형성 분화는 미세펠렛(micropellet) 형태로 이루어졌으며 조직 덩어리(tissue aggregate) 속의 글리코스아미노글리칸 생성을 통하여 확인되었다.

4. 실시예 4 : 태반 줄기세포를 이용한 종양 억제

[0298] 본 명세서에 기술한 태반 줄기세포는 종양 세포 성장과 증식을 억제하는 능력을 지닌다.

4.1 실험 방법과 재료

[0299] 사용한 종양 세포주로는 실험실 기증자로부터 받은 림프모세포상 세포주(LCL)과 ATCC에서 구입한 사람 세포주(CML-CRL-2099; 관상 유방암종-CRL-2343; 급성 림프모세포성 백혈병-CCL-119; 대장 암종-CRL-5942)가 포함된다. 사용한 세포주로는 사람 망막모세포종, 조직구 림프종, 폐암종, 금성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 대장 선암종과 유방암종 세포주가 포함된다. LCL은 말초 혈액 단핵세포를 용해성 EBV 세포주(lytic EBV line)인 B95.8로부터 얻은 EBV와 사이클로스포린 A의 존재하에 배양하여 얻었다. R20 배지(RPMI 1640과 소 태아 혈청(Celgro)) 속에서 두 주를 보내고, 이 암세포를 R10 배지 속에서 유지하였다. 종양 세포주도 R10 배지 속에서 유지하였다.

[0300] 제대 조직을 효소 소화하여 얻은 제대 줄기세포(제3계대)를 트랜스웰 삽입물(transwell insert) 없이 또는 그와 함께 96 웰 플레이트 또는 24 웰 플레이트에 발라주었다. 태반 줄기세포와 종양 세포의 공동 배양은 각 실험에 표시한 세포 수(아래 참조)의 세포를 이용하여 수행하였다. 배양 후 비부착성 종양 세포를 수집하고 7-아미노-악티노마이신 D(7-ADD)로 염색하여 생존률을 평가하였다.

[0301] 상층액 사이토kin 분석을 위해서 배양 상층액 50 μ L를 모아 25종의 사이토킨이 설치된 어레이를 이용하여 LUMINEX(등록상표) 분석기로 분석하였다: IL-1 β , IL-1ra, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, MIG, 에오택신(Eotaxin), RANTES, MCP-1

4.2 결과

4.2.1. 여러 종양 세포주의 억제

[0302] 태반 줄기세포의 종양 억제능을 살펴보기 위하여 앱스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV) 변환된(transformed) 종양 세포를 단독으로 또는 서로 다른 태반내 자리에서 취한 태반 줄기세포와 함께 배양하였다. LCL 세포만의 배양에서는 17일 동안 약 40,000 세포로 자라났다. 하지만 LCL 세포를 양막(transformed -융모막(AC) 또는 양막(AM) 또는 제대(UC) 유래의 줄기세포의 존재하에 1:2의 비율로 배양하자, 성장은 약 10,000 세포에서 억제되었고, 억제도는 약 75%(도 10)이었다.

[0303] 태반 줄기세포의 LCL 종식 억제를 골수 유래 중간엽 줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BM-MSC)와 비교하였다. LCL을 단독으로 배양 또는 태반 줄기세포 또는 UC 줄기세포 또는 BM-MSC와 함께 6일 동안 배양한 다음, 그 시점에 배양물마다 세포 수를 세었다. 6일 동안의 배양 기간 동안 LCL 단독 배양에서는 약 23,000 세포로 증식하였다. 반면에 LCL+BM-MSC를 1:2 비율로 배양한 결과는 약 38,000 LCL 세포였다. 그러나 놀랍게도, LCL+태반 줄기세포(1:2) 조건은 6일 동안의 배양에서 대략 5,000 LCL 세포를 낳았을 뿐이었는데, 이는 태반 줄기세포 또는 제대 줄기세포가 BM-MSC보다 LCL의 성장을 유의하게 더 억제한다는 것을 가리킨다. 도 11을 보라.

[0309] 태반 줄기세포의 종양 억제 특이성을 측정하기 위하여 종양 세포주의 사람 암 역학적 연관성을 바탕으로 여러 종양 세포주의 모음을 설계하였다. 모든 종양 세포주는 부착성 태반 줄기세포와 분리를 쉽게 하기 위하여 혼탁하여 배양하였다. 태반 줄기세포가 가지는 종양 세포 억제 효과를 측정하기 위하여 조직구 림프종 세포, 백혈병(CML) 세포, 관상 유방암종 세포, 급성 림프모세포성 백혈병 세포 또는 대장 암종 세포를 0:1, 1:2, 1:1, 1.5:1이나 2:1의 비율로 조합한 종양 세포(도 12)에 대하여 역가 측정 실험을 하였다. 태반 줄기세포는 태반 줄기세포:종양 세포 비율이 2:1일 때 조직구 림프종과 CML을 가장 잘 억제하는 것으로 보였는데, 이 때 억제도는 각각 60%와 48%였다. 그러나 이들 세포주들은 시험한 세포 혼합비에서 약한 용량 반응성(dose response)만을 가지는 것처럼 보였다. 관상 유방암종 세포주는 용량 반응성의 경향을 더 뚜렷이 드러냈는데, 이는 급성 림프모세포성 백혈병(ALL) 세포주도 마찬가지였다. 특이하게, 대장 암종 세포는 태반 줄기세포 수가 많아졌을 때 더 낮은 억제도를 나타냈다.

[0310] 더 큰 종양 세포 모음을 사용하고, 태반 줄기세포 대 종양 세포 비를 1:1로 하여 동일한 방식으로 한 후속 실험(도 13)에서는 앞의 결과를 확인하고 나아가 폭을 넓혔다. 유방암종과 ALL을 뺀 모든 종양 세포주는 태반 줄기세포 없이 자란 종양 세포와 비교하였을 때, 50%에서 75% 정도 억제되었다. 이전 실험에서 약하게 억제되었던 유방암종과 ALL(10%에서 20%)은 그러나 공동 배양 중 태반 줄기세포에 의하여 활성화되는 것처럼 보였다. 즉 공동 배양이 유방암종과 ALL 세포 수를 늘리는 것으로 관측되었다.

[0311] 억제의 접촉 의존성은 트랜스웰 실험으로 평가하였다(도 13B). HL은 12%로 가장 낮은 접촉 의존성을 나타내었다. CML의 억제는 22% 접촉 의존성이었고, CAC는 42%, LCL은 51% 접촉 의존성이었다. 이 결과는 종양 세포주의 성장 속도와 억제의 접촉 의존성 사이에 일반적으로 반비례 관계가 있다는 것을 나타낸다.

[0312] 이러한 결과를 종합할 때, 데이터는 망막모세포종, 조직구 림프종과 CML이 태반 줄기세포에 의하여 가장 안정적으로 억제된다고 시사하고 있다.

4.2.2. 사이토킨 분비 경향

[0314] 태반 줄기세포의 종양 억제에서 분비 경향을 살펴 보기 위하여, 태반 줄기세포의 배양물에서 상층액을 수집하고, 25종의 사이토킨을 설치한 어레이를 이용하여 LUMINEX(등록상표) 분석기로 분석하였다. LCL만을 사용한 실험과 LCL 세포를 포함하는 8종의 종양 세포주 모음을 사용한 두 가지 실험을 수행하였다. 첫째 실험에서 태반 줄기세포와 LCL을 6일 동안 배양하고나서, 배양 혼탁액 속 LCL 세포를 수집한 다음 살아 있는 7-AAD 세포 수를 세었다. 도 14A에 나타낸 바와 같이, 태반 줄기세포에 의한 LCL 증식 억제는 접촉에 크게 의존하는데, 이는 태반 줄기세포가 개방웰 공동 배양에서는 LCL 증식을 억제했지만, 트랜스웰 공동 배양에서는 억제하지 못했다는 것으로부터 알 수 있다. 그러나 사이토킨 분비 경향은 개방웰과 트랜스웰 조건 사이에 거의 바뀌지 않았다(도 14B). LCL 단독 배양에서는 MIP-1 α 와 MIP-1 β 를 ng/mL 범위에서 분비하였는데, 공동 배양에서는 IL-6, IL-8과 MCP-1을 태반 줄기세포의 단독 배양에서 볼 수 있는 양에 해당하는 분량으로 포함하고 있었다. MIP-1 α 와 MIP-1 β 의 양은 의미 있게 변하지 않았다.

[0315] 더 다양한 종양 세포주 시료에 대하여 사이토킨 분비 경향을 살펴 보기 위하여, 도 15A와 15B에 기술한 실험의 공동 배양물로부터 상층액을 취하여 동일한 25종 사이토킨 어레이로 분석하였다. LCL/PDAC 공동 배양물의 분비 경향은 IL-6, IL-8과 MCP-1이 예상한 분량으로 검출되었다는 점에서 대부분 유사하였다. 그러나 MIP-1 α 와 MIP-1 β 는 유의한 양으로 검출되지 않았다. 조사한 나머지 7개의 종양 세포주 중에서는 조직구 림프종이 LCL과 비슷한 분비 경향을 나타내었고, 나머지 6 세포주는 전체적으로 위축된 분비 경향을 보였다.

4.2.3. 결 론

[0317] 실시예에 나타낸 데이터로부터, 태반 줄기세포가 조직구 림프종, 만성 골수성 백혈병, 대장 선암종, 망막모세포종과 폐암종을 비롯한 광범위한 종양 세포주에 대하여 종양 세포 성장 억제 효과를 나타낸다고 결론지을 수 있다. 이를 종양 세포주는 다양한 세포원, 즉 상피, 샘세포, 조혈세포원에서 유래하는데, 이는 태반 줄기세포가 임상 용도에서 광범위한 유형의 종양에 대하여 유효할 수 있다는 것을 가리킨다. 이러한 효과는 부분적으로 접촉 의존성이며, 이 접촉 의존성은 종양의 성장 속도와 상관 관계가 있을 수 있다. 시험한 8종의 종양 세포주 중, 유방암종과 ALL 세포는 태반 줄기세포와 공동 배양했을 때 활성화하는 것으로 보인다.

5. 실시예 5 : 태반 줄기세포를 이용한 만성 골수성 백혈병 세포의 억제

[0319] 본 발명의 태반 줄기세포는 거핵모세포 백혈병 세포들의 성장을 접촉에 무관하게 억제하는 능력을 보여 준다.

[0320] 5.1. 실험 방법과 재료

[0321] 이 실험에 쓰인 종양 세포주로는 만성 골수성 백혈병 세포주인 MEG-01(megakaryoblastic leukemia cells, ATCC # CRL-2021), 조직구 림프종과 망막모세포종 세포주가 포함된다.

[0322] 제대 줄기세포(UC), 양막-융모막 줄기세포(AC), 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC) 또는 사람 텃줄 정맥 내피 세포(HUVEC)를 단독으로 또는 종양 세포와 함께 24월 조직 배양 플레이트에서 시작 세포 수를 월 당 5×10^4 개로 하여 6일 동안 배양하였다. 따라서 태반 줄기세포와 종양 세포를 1:1 비율로 공동 배양한 경우, 각 세포 유형마다 한 월에 세포 5×10^4 개를 파종하였다. 세포비를 5:1로 한 곳은 태반 줄기세포 25×10^4 개와 종양 세포 5×10^4 개를 파종하였다. 종양 세포의 억제는 대조군 배양물(종양 세포 단독) 속 살아 있는 세포 수에 대하여 공동 배양물 속 살아 있는 세포(아넥신 V⁻, 7-AAD⁻) 수를 비교하여 계산하였다.

[0323] 세포 자멸사 실험을 위하여 공동 배양한 MEG-01 세포를 수집하고 공동 배양 0, 3, 6일째에 아넥신 V와 요오드화 프로피odium으로 염색한 다음 흐름 세포 측정법으로 분석하였다. 세포 주기 분석을 위하여, 공동 배양 개시 후 제 0, 1, 2, 3, 4, 6일에 공동 배양한 세포를 고정하고, 투과 처리(permeabilization)한 다음, 요오드화프로피odium으로 염색하여 흐름 세포 측정법으로 DNA 함량 분포를 분석하였다.

[0324] 상층액 사이토킨 분석을 위해서 배양 상층액 50 μL를 모아 LUMINEX(등록상표) 분석기로 다음 사이토킨에 대하여 분석하였다: 혈소판 유래 성장 인자 AA(PDGF-AA), 과립구-단핵구 콜로니 성장 인자(GM-CSF), 성장 관련 종양유전자 α(GRO α), 백혈병 억제 인자(LIF), 종양 괴사 인자 α(TNF α), 섬유모세포 성장 인자-2(FGF-2), 상피 성장 인자(EGF), 가용성 인터류킨-2(sIL2), 혈관 내피 성장 인자(VEGF).

[0325] 5.2. 결과

[0326] 태반 줄기세포가 BM-MSC보다 더 향상된 종양 세포 성장 억제 효과를 지닌다는 것을 새로운 종양 세포주에서 뒷받침하기 위하여, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포에서 태반 줄기세포에 의한 성장 억제 효과를 측정하였다. MEG-01(거핵모세포 백혈병) 세포를 6일 동안 단독으로 또는 BM-MSC 또는 제대 줄기세포(UC) 또는 양막-융모막 줄기세포(AC)와 함께 1:1 비율로 배양하였다. 백분율 억제도는 다음 식에 따라 결정하였다.

$$[0327] 100 - \left[\frac{\text{공동 배양물에서 아넥신 V}^-, 7\text{-AAD}^-\text{인 세포 수}}{\text{단독 배양물에서 아넥신 V}^-, 7\text{-AAD}^-\text{인 세포 수}} \times 100 \right]$$

[0328] MEG-01 세포와 BM-MSC의 공동 배양은 6일 동안의 공동 배양 후 약 25%의 성장 억제를 나타내었다. 그러나 MEG-01 세포를 제대 줄기세포 또는 AC 태반 줄기세포와 공동 배양하면 6일 후 75%보다 더 큰 억제도를 나타내었다. 양막-융모막 세포와 공동 배양하면 90%보다 더 큰 억제도를 나타내었다(도 16A). 조직구 림프종 세포와 망막모세포종 세포 역시 제대 줄기세포와 공동 배양했을 때 억제되었다. 그러나 이를 세포주의 억제 정도는 MEG-01 세포에서 보았던 억제 효과에 비해서는 완만한 수준(HL은 ~20%, Rb는 ~50%)이었다.

[0329] BM-MSC에 의한 억제에 비교한 태반 줄기세포에 의한 MEG-01 억제의 시간 진행을 도 16B에 나타내었다. MEG-01 세포의 두드러진 억제는 2일째에 BM-MSC와 제대 줄기세포의 공동 배양물 양쪽 모두에서 볼 수 있다. 그러나 6일째에 UC 공동 배양물에서는 성장 억제가 강하게 유지되었지만, BM-MSC 공동 배양에서는 완만하게 억제될 뿐이었다. 이 결과는 태반 줄기세포가 BM-MSC보다 만성 골수성 백혈병(CML) 세포에서 향상된 종양 세포 성장 억제를 나타내는 것을 증명하며, LCL 세포에서 보았던 태반 줄기세포의 향상된 종양 억제 효과를 재확인한다. 이 결과는 또한 CML 세포가 다른 혈액 종양 세포 유형들, 예를 들어 조직구 림프종이나 망막모세포종 등의 고형 종양 세포 유형보다 태반 줄기세포에 의한 억제에 특히 취약하다는 것을 시사한다.

[0330] 어느 특정한 기전이나 이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 제대 줄기세포가 종양 세포 성장의 억제 효과를 낳는 방식에 관하여 연구를 하였다. 특히 6일 동안 제대 줄기세포와 공동 배양한 MEG-01 세포를 대상으로 세포 자멸사 표지의 존부, 세포 주기 중단의 유발 여부, 거대 핵세포(megakaryocyte) 계통으로의 세포 성숙에 관하여 조사하였다. 세포 자멸사 유발에 의하여 성장 억제가 이루어지는 것으로 보이지는 않았는데, 이는 MEG-01 세포를 단독 배양하거나, MEG-01 세포를 HUVEC 세포와 함께 배양한 경우(데이터 표시 않음)와 비교하였을 때, 제대 줄기세포와 공동 배양한 MEG-01 세포에서 살아 있는 세포(아넥신 V⁻, PI⁻), 세포 자멸사 중인 세포(아넥신 V⁺, PI⁻), 괴사 중인 세포(아넥신 V⁺, PI⁺)의 백분율에 유의미한 차이가 없었기 때문이다. 더욱이 제대 줄기세포와 공동 배양하는 것이 세포 주기 정지를 유발하는 것으로 보이지도 않았는데, 이는 단독 배양하거나, 제대 줄기세

포, HUVEC 또는 BM-MSC와 공동 배양한 MEG-01 세포(데이터 표시 않음) 사이에서 DNA 함량 분포가 유의미하게 차이가 나지 않았기 때문이다. 또한 제대 줄기세포에 의한 MEG-01 성장 억제는 거핵세포 계통을 따라 세포가 성숙하였기 때문에 일어난 것으로 보이지도 않았는데, 이는 제대 줄기세포, BM-MSC 또는 HUVEC 세포와 함께 공동 배양한 MEG-01 세포 모두에서 거핵모세포 성숙 표지(maturation marker)인 CD36이 비슷한 유도 수준을 나타내었기 때문이다(데이터 표시 않음). 따라서 제대 줄기세포에 의한 MEG-01 억제는 세포 자멸사, 세포 주기와 세포 성숙에 무관하게 일어나는 것으로 보인다.

[0331] 5.2.1 태반 줄기세포에 의한 접촉 비의존성 MEG-01 성장 억제

[0332] 태반 줄기세포에 의한 MEG-01 성장 억제의 접촉 의존성을 살펴 보기 위하여, 억제된 MEG-01/태반 줄기세포의 공동 배양물에서 얻은 조건 배지를 이용한 성장 억제 분석을 행하였다(도 17). MEG-01 세포는 RPMI-기반 배지 속에서 배양하였고, 배지를 MEG-01/제대 줄기세포 공동 배양물, MEG-01/BM-MSC 공동 배양물 또는 MEG-01/HUVEC 공동 배양물에서 얻은 조건 배지로 1:2 또는 1:10 비율(조건 배지 대 비조건 배지)로 교체하였다. 음성 대조군(MEG 단독) 세포는 시작 배지를 조건 배지로 바꿔주지 않고 배양하였다. 양성 대조군으로서, MEG-01 세포를 또한 제대 줄기세포와 직접 공동 배양(MEG/UC)하였다. MEG-01/제대 줄기세포 공동 배양물 유래 조건 배지로 처리(1:2)한 MEG-01 세포는 제대 줄기세포와 직접 공동 배양한 MEG-01 세포와 같은 정도로 억제되었는데, 이는 제대 줄기세포가 생성한 가용성 인자(soluble factor) 때문에 MEG-01 세포의 성장이 억제된다는 것을 시사한다.

[0333] 5.2.2 사이토킨 분비 경향

[0334] 공동 배양 배지 속에 있는 가용성 인자가 MEG-01 세포의 억제에 관련되어 있는지를 살피기 위하여, MEG-01, UC 줄기세포, BM-MSC와 HUVEC 세포의 단독 배양 또는 UC 줄기세포와 공동 배양한 MEG-01 세포, BM-MSC와 공동 배양한 MEG-01, HUVEC와 공동 배양한 MEG-01로부터 얻은 상층액을 각각 배양 6일째에 수집하여 다음 사이토킨의 함유 여부를 조사하였다: FGF-2, TNF α , GM-CSF, PDGF, EGF, GRO α , sIL-2, VEGF, LIF. PDAC 세포를 MEG-01 세포와 공동 배양하였을 때 PDGF-AA와 GM-CSF가 고도로 분비되는 것을 발견하였는데, 그 분비량은 각 세포주를 단독으로 배양하였을 때 볼 수 있는 양을 넘었다(도 18). PDAC/MEG-01 공동 배양에서 GRO α 는 고도로 분비되었고, 비슷한 양의 GRO α 를 단독 배양한 PDAC 세포에서 찾을 수 있었다.

[0335] 5.2.3 결론

[0336] 거핵모세포 백혈병 세포주인 MEG-01의 성장 억제 실험 결과는 태반 줄기세포와 공동 배양하면 골수 유래 중간엽 줄기세포와 공동 배양할 때보다 종양 세포 성장 억제 효과가 향상된다는 것을 시사한다. 작용 방식에 관한 특정 이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 억제는 성장의 저해로 말미암은 결과이지, 세포 자멸사의 유발, 세포 주기 정지 또는 MEG-01 세포가 거핵세포 계통으로 성숙하기 때문에 일어나는 것은 아닌 것으로 보인다. 태반 줄기세포에 의한 억제는 가용성 성장 인자의 작용과 관련이 있을 수 있다. 후보가 되는 인자로는 PDGF-AA, GM-CSF, GRO- α 와 LIF를 들 수 있다. 어떠한 이론에도 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 이러한 인자가 분비되면 선천 면역과 적응성(adaptive) 면역 기능을 끌어들이는 것을 통하여 태반 줄기세포의 성장 억제 효과를 향상 시킴으로써 생체 내에서 유익한 효과를 발휘할 수 있을 것이라고 생각하고 있다.

[0337] 거핵모세포 백혈병 세포는 시험한 다른 종양 세포주(조직구 림프종, 망막모세포종)에 비하여 태반 줄기세포 공동 배양에 대하여 더 예민한 반응을 보였는데, 이는 태반 줄기세포 조성물을 치료에 적용했을 때 특히 만성 골수성 백혈병에서 반응이 좋을 수 있다고 시사한다.

6. 실시예 6 : 태반 줄기세포를 이용한 백혈병과 림프종 세포의 억제

[0338] 6.1. 실험 방법과 재료

[0339] MEG-01과 만성 골수성 백혈병 세포주에서 얻은 결과를 재확인하고 확장하기 위하여, 더 많은 백혈병과 림프종 세포주가 제대 줄기세포와 양막-용모막 줄기세포에 의하여 접촉에 무관하게 억제되는지 시험하였다. 이 실험에 쓰인 세포주는 ATCC에서 입수할 수 있는 다수의 백혈병 세포주를 포함하였는데, 여기에는 거핵모세포 림프종 세포주 MEG-01(ATCC 번호 CRL-2021), 급성 림프종 백혈병 세포주 CCRF-CEM(ATCC 번호 CCL-119), 급성 T-세포 백혈병 세포주 J.RT3-T3.5(ATCC 번호 TIB-153), 조직구 림프종 U937(ATCC 번호 CRL-1593.2), 골수 유래 급성 골수성 백혈병 세포주 KG-1(ATCC 번호 CRL-8031)과 만성 골수성 백혈병 세포주 KU812(ATCC 번호 CRL-2099)가 포함된다.

[0340] 간략하게, 종양 세포주를 24웰 조직 배양판에서(단, 이하 달리 표시한 경우에는 다른 곳에서) 단독으로 배양하거나, 제대 줄기세포(UC) 또는 양막-용모막 태반 줄기세포(AC)와 함께 직접 공동 배양(DC) 또는 트랜스웰(TW)

방식으로 공동 배양하였는데, (줄기세포 대 종양 세포의) 비율은 (달리 언급하지 않는 경우는) 1:1과 5:1로 하여 도포하였다. 이례 동안 배양한 다음, 종양 세포를 혼탁액으로부터 수집하고, 인산 완충 용액 200 μL 속에 혼탁한 다음, 아넥신 V와 요오드화프로파碇(PI)으로 염색하였다. 살아 있는 세포(아넥신 V⁻, PI⁻) 수를 Becton Dickinson사 FACSCalibur 흐름 세포 측정기로 측정하였다.

[0342] 6.2. 결과

[0343] 백혈병과 림프종 세포주에 대한 성장 억제 분석 결과를 표 3에 나타내었다. 백분율은 7일째 공동 배양에서 남아 있는 살아 있는 세포 수를 단독으로 배양한 대조군 세포 수에 비교한 백분율이다.

표 3

[0344] 제대 줄기세포와 양막-용모막 줄기세포에 의한 백혈병과 림프종 세포주의 억제

줄기세포주 (제대(UC) 양막-용모막(AC))	종양 세포주	1:1 TW	1:1 DC	5:1 TW	5:1 DC	1:1 TW MEG-01	1:1 DC MEG-01
UC1	CCRF-CEM	49%	32%	16%	3%	42%	16%
UC1	CCRF-CEM	48%	34%	16%	7%	60%	21%
AC1	CCRF-CEM	79%	49%	43%	31%	55%	41%
UC1	J.RT3-T3.5	56%	27%	28%	19%	71%	45%
AC1	J.RT3-T3.5	74%	105%	69%	34%	34%	28%
UC1	U937	50%	19%	11%	16%	45%	20%
UC1	KG1	76%	18%	60%	27%	43%	31%
UC1	KG1	68%	44%	50%	21%	53%	47%
UC2	KG1	131%	88%	139%	27%	50%	51%
UC3	KG1	117%	74%	17%	10%	31%	23%
UC4	KG1	118%	21%	82%	22%	38%	34%
AC1	KG1	87%	81%	102%	62%	68%	44%
UC4	KU812	47%	8%	23%	5%	67%	26%
AC1	KU812	91%	71%	42%	16%	58%	27%
AC1	KU812	21%	8%	17%	해당 무	48%	27%
AC1	KU812	12%	17%	12%	해당 무	69%	87%
AC2	KU812	42%	10%	42%	9%	49%	56%

[0345] CCRF-CEM 세포주는 태반 줄기세포주인 UC1과 AC1에 의하여 직접 배양과 트랜스웰 방식 모두에서 억제되었다. 태반 줄기세포와 직접 공동 배양한 경우가 CCRF-CEM 성장을 억제하는데 트랜스웰 방식보다 약간 더 효과적이었다. 직접 배양과 트랜스웰 방식 모두에서 세포 비율 5:1쪽이 CCRF-CEM 성장을 억제하는데 더 효과적이었다.

[0346] U937 세포주에서도 비슷한 결과를 볼 수 있었다. 직접 공동 배양에 의한 억제는 트랜스웰 방식 억제보다 다만 약간 더 효과적일 뿐이었고, 5:1 비율이 최적 비율이었다. KG-1 세포는 제대 줄기세포 또는 태반 줄기세포와 직접 배양하는 것에 대하여 일반적으로 덜 예민하였다. 그러나 여전히 제대 줄기세포주인 UC1, UC3과 UC4와 공동 배양하였을 때는 직접 공동 배양과 트랜스웰 방식 모두에서 성장 억제를 관찰할 수 있었다. KG-1 세포의 억제는 트랜스웰 방식보다 직접 배양시 더 높았으며, 5:1 혼합비율이 1:1보다 더 높은 억제 효과를 나타내었다. KU812 세포는 태반 줄기세포와 공동 배양에 대한 취약성이 가장 높았는데, 시험한 거의 모든 조건에서 억제도가 50%보다 더 컸다. 직접 배양에 의한 억제가 트랜스웰 억제보다 더 효과적이었다. 그러나 트랜스웰 방식에서 KU812 억제도 혼합비 1:1에서 50%보다 더 컸다.

[0347] 성장 억제가 T24 조직 배양 웰 속에서 7일 동안의 공동 배양에 따른 영양분의 고갈에 말미암은 것일 가능성을 배제하기 위하여, 상기 24 웰 분석에서 쓰인 것과 같은 수(50×10^3 MEG-01 세포)의 개시 세포를 T25 플라스크에서 공동 배양하였다. 즉 실질적으로 공동 배양은 T24 실험에서 제공한 것보다 열 배 더 많은 영양분 속에서 진행되었다. UC 줄기세포와 1:1의 비율로 7일 동안 공동 배양한 MEG-01 세포는 51% 억제되었다. 5:1 비율로 배양하였을 때 MEG-01 세포는 69% 억제되었다. 유사하게, MEG-01 세포를 AC 줄기세포와 1:1 비율로 7일 동안 공동 배양하였을 때는 53% 억제를 관찰하였다. 5:1 비율로 배양하였을 때는 66% 억제를 관찰하였다(데이터 표시

않음). 이러한 결과는 시험관 내에서 태반 줄기세포가 MEG-01 세포를 억제하는 것이 배양 환경에서 영양분이 고갈되었기 때문이 아니라는 것을 가리킨다.

[0348] 6.2.1 결론

[0349] 종합했을 때 이러한 실험 결과는 제대 줄기세포와 양막-융모막 줄기세포에 의한 백혈병과 림프종 세포주의 성장 억제가 왕성하게 일어나고, 접촉에 무관하게 일어날 수 있다는 것을 보여준다. 비록 같은 종양 세포 유형에 대하여 실험마다 억제 정도에서 편차를 볼 수 있었지만, 이러한 결과는 다양한 세포 유형의 혈액 종양에 대하여 태반 줄기세포, 예를 들어 제대 줄기세포와 양막-융모막 줄기세포가 가지는, 직접적인 또는 접촉에 무관한 성장 억제력을 일반적으로 반영한다. 줄기세포 대 종양 세포 비율을 5:1로 하여 직접 공동 배양하였을 때, 제대 줄기세포와 양막-융모막 줄기세포는 모두 시험한 매 종양 세포주마다 50%를 넘는 억제 효과를 일관되게 나타내었다(다만 AC1 줄기세포주로 처리한 KG1 세포는 예외인데, 38% 억제를 관찰하였다). 따라서 이들 데이터는 여러 가지 종양을 치료하는 임상 용도로 태반 줄기세포를 이용하는 것을 더 한 층 뒷받침하는데, 특히 거핵모세포 림프종, 급성 림프모세포 백혈병, 급성 T-세포 백혈병, 조직구 림프종, 골수의 급성 골수성 백혈병과 만성 골수성 백혈병을 비롯한 다양한 세포 유형의 혈액 종양의 치료에 태반 줄기세포를 사용하는 것을 뒷받침한다.

[0350] 7. 실시예 7 : SDF-1에 응답한 태반 줄기세포의 이동

[0351] 본 발명의 태반 줄기세포는 세포 화학 유인 물질인 SDF-1의 존재에 반응하여 이동할 수 있는 능력을 보여 준다.

[0352] 7.1. 실험 방법과 재료

[0353] 화학 유인 물질에 응답하여 이동하는 태반 줄기세포의 능력을 시험하기 위하여, Cell Biolabs사의 CYTOSELECT (상표) 세포 이동 분석 키트를 써서 버팀질 세포 유래 인자-1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)의 존재 하에서 태반 줄기세포의 이동을 측정하였다. 이 분석법은 24 웰 플레이트 속에 공극 크기 8 μm 의 폴리카보네이트 삽입막(membrane insert)을 제공한다. 이 삽입막은 비이동성 세포와 이동성 세포를 가려내는 장애물 구성을 한다. 이동성 세포는 세포 화학 유인 물질 쪽으로 (액틴 세포 골격의 재구성을 통하여) 돌기를 뻗을 수 있고 마침내는 폴리카보네이트 막의 공극을 통과한다. 이러한 이동성 세포는 이 막으로부터 떨어져 나오고, 이어서 세포의 핵산에 결합하면 형광하는 염료(CYQUANT(등록상표) GR 염료, 미국 캘리포니아주 Carlsbad의 Invitrogen Corporation사)를 써서 검출할 수 있다. 간략하게, 제대 줄기세포를 무혈청 배지 속에서 세포 혼탁액으로 마련하였다. SDF-1을 이 세포 혼탁액에 단독으로 직접 가하거나, SDF-1 수용체 CXCR4의 억제제(AMD3100)와 함께 가하였다. 세포 배양기에서 24시간을 보낸 후 세포를 분석하였다.

[0354] 7.2. 결과

[0355] 도 19는 제대 태반 줄기세포가 소 태아 혈청과 SDF-1 쪽으로 이동하였다는 것을 보여 준다. 혈청이나 SDF-1 없이 배양한 태반 줄기세포는 24시간 배양 후 형광 단위로 6.0에 해당하는 거리를 이동하였다. 세포 혼탁액에 10% FBS를 가하자 24시간 배양 후에 형광 단위로 12.7에 해당하는 거리를 세포가 이동하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 SDF-1 을 가하자 24시간 배양 후에 이동 거리는 형광 단위로 15.0에 해당하였다. 그러나 SDF-1 수용체 CXCR4의 억제제인 AMD3100을 가하자, SDF-1에 대응한 태반 줄기세포의 이동이 유의미하게 억제받았다. SDF-1과 AMD3100이 모두 존재할 때 태반 줄기세포의 이동은 24시간 후에 형광 단위로 7.0에 해당하였는데, 이는 SDF-1이나 혈청을 가하지 않았을 때 볼 수 있는 이동 수준에 가까웠다.

[0356] 결론

[0357] 이러한 실험 결과는 태반 줄기세포가 특정 화학 유인 물질에 응답하여 이동하는 능력을 지닌다는 것을 보여 준다. 많은 종양 세포에서 SDF-1 수용체인 CXCR4를 발현한다. 그러므로 이러한 결과는 SDF-1과 태반 줄기세포를 종양 자리에 같이 투여하면 이 표적 종양 자리에 태반 줄기세포가 자리 잡는데 드는 시간을 끌 수 있고, 태반 줄기세포와 종양 세포의 상호작용을 촉진함으로써 태반 줄기세포의 종양 세포 성장 효과를 향상시킬 수 있다는 것을 가리킨다.

[0358] 균등률

[0359] 본 발명은 본 명세서에서 기술한 특정 실시 태양의 범위 내로 한정되지 아니한다. 실제로 당업자에게는 앞선 기재와 첨부 도면의 내용으로부터 전술한 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 있을 수 있다는 점은 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부하는 청구범위 내에 포함되는 것이다.

[0360] 본 명세서에서 인용하는 많은 간행물, 특히와 특히 출원은 그 전문에서 개시하는 바를 참고 문헌으로 삼고

있다.

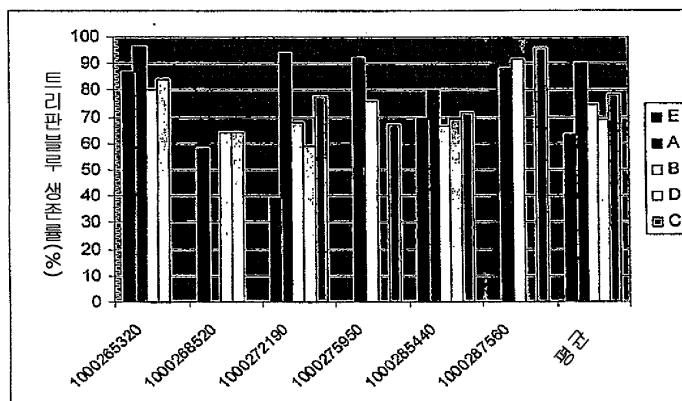
도면의 간단한 설명

- [0222] 도 1은 (A) 관류, (B) 양막, (C) 용모막, (D) 양막-용모막판(ammion-chorion plate) 또는 (E) 제대 줄기세포에서 얻은 태반 줄기세포의 생존률(viability)을 나타낸다. x축의 숫자는 상기 줄기세포를 얻은 태반을 가리킨다.
- [0223] 도 2는 A) 관류, (B) 양막, (C) 용모막, (D) 양막-용모막판 또는 (E) 제대에서 얻은 세포 중 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 백분율을 FACSCalibur로 측정한 것을 나타낸다. x축의 숫자는 상기 줄기세포를 얻은 태반을 가리킨다.
- [0224] 도 3은 A) 관류, (B) 양막, (C) 용모막, (D) 양막-용모막판 (E) 제대에서 얻은 세포 중 HLA ABC⁻/CD45⁻/CD34⁻/CD133⁺ 세포의 백분율을 FACSaria로 측정한 것을 나타낸다. x축의 숫자는 상기 줄기세포를 얻은 태반을 가리킨다.
- [0225] 도 4는 태반 관류물에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.
- [0226] 도 5는 양막에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.
- [0227] 도 6은 용모막에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.
- [0228] 도 7은 양막-용모막판에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.
- [0229] 도 8은 제대에서 유래한 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 발현을 나타낸다.
- [0230] 도 9는 A) 관류, (B) 양막, (C) 용모막, (D) 양막-용모막판 또는 (E) 제대 유래의 줄기세포에서 HLA-G, CD10, CD13, CD33, CD38, CD44, CD90, CD105, CD117, CD200의 평균 발현을 나타낸다.
- [0231] 도 10. 태반 줄기세포와 제대 줄기세포는 림프모세포상(母細胞狀) 세포주(lymphoblastoid cell line, LCL)의 종양 성장을 억제한다. LCL을 단독으로 또는 양막-용모막(AC) 또는 양막(AM) 혹은 제대(UC) 유래 줄기세포와 함께 17일 동안 배양하였다. 태반 줄기세포 대 LCL의 비율은 2:1이었다. 대형 AAD⁻ 세포 수를 측정하였다(UC는 n=3).
- [0232] 도 11. 태반 줄기세포는 종양 세포를 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)만큼 효율적으로 살상한다. LCL을 BM-MSC 또는 제대 줄기세포(UC)와 함께 6일 동안 공동 배양하였다(n=1).
- [0233] 도 12. 태반 줄기세포 종양 억제의 용량 의존성. 조직구 암종, 만성 골수성 백혈병(CML), 유방암종, 급성 림프세포 백혈병(acute lymphocytic leukemia, ALL)과 대장 암종 세포를 단독으로 또는 1:2, 1:1, 1.5:1과 2:1의 비율로 태반 줄기세포와 함께 배양하였다. 공동 배양 후 살아 있는 7-AAD⁻ 세포의 수를 측정하였다. 자유로이 성장하던 배양 세포를 태반 줄기세포가 억제하는 정도를 이어서 계산하였다. 자유 성장하는 종양 세포의 절대 수는 그림 설명의 각 세포주 표시 뒤의 괄호 속에 나타내었다(숫자는 10^5 개의 세포를 가리킨다). n=4인 LCL을 제외하고는 n=2이다.
- [0234] 도 13A와 13B. 태반 줄기세포에 의한 종양 억제의 억제 정도와 접촉 의존성. A. 트랜스웰(검은색 막대) 또는 개방웰(A, 흰 막대) 속에서 조직구 암종, 만성 골수성 백혈병, 관상 유방암종(breast duct carcinoma), LCL, 망막모세포종, 폐암종, 유방암종과 급성 림프세포 백혈병 세포를 단독으로, 또는 태반 줄기세포와 함께 1:1의 비율로 배양하였다. 6일 뒤, 살아 있는 7-AAD⁻ 세포 수를 세고, 자유 성장 배양 세포의 세포 수 측정값(B에 삽입한 숫자)을 바탕으로 억제 정도를 계산하였다. B: 이 억제 데이터로부터 접촉 의존성을 계산하였다. n=2인 LCL을 제외하고 트랜스웰은 n=1이다.

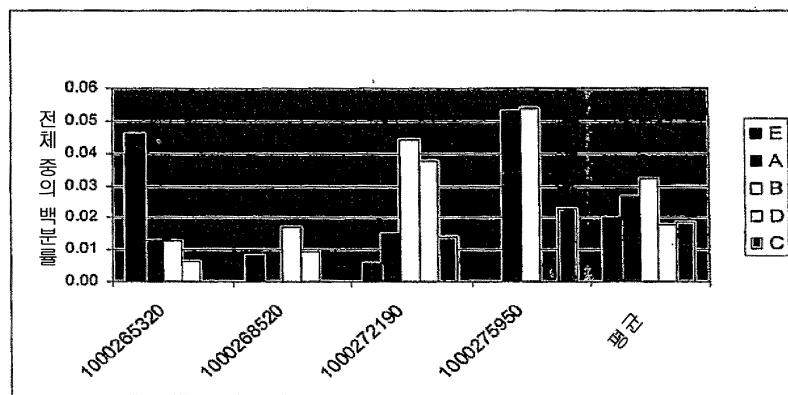
- [0235] 도 14. 도 13A와 도 13B에 결과를 나타낸 실험의 배양 상층액 속의 사이토킨의 고도 발현. 조사한 사이토킨 25종 중에서 IL-6, IL-8과 MCP-1이 LCL과 조직구 림프종에서 나타났다. 도 15A와 15B를 비교하라.
- [0236] 도 15A와 15B. LCL/태반 줄기세포 공동 배양물의 사이토킨 분비 경향. A: LCL을 단독으로 또는 태반 줄기세포 와 함께 개방웰(LCL PDAC) 또는 트랜스웰(LCL PDAC TW) 속에서 배양하였다. 살아 있는 CD23⁺ 세포 수를 흐름 세포 측정기로 세었다. B: A 실험의 상층액을 Luminex로 분석하였다. n=2.
- [0237] 도 16A와 16B. A: 태반 줄기세포와 골수 유래 중간엽 줄기세포(BM-MSC)에 의한 종양 세포주의 억제. 거핵모세포 백혈병(megakaryocyte leukemia) 세포주인 MEG-01, 조직구 림프종, 망막모세포종과 만성 골수성 백혈병 세포를 단독으로 배양 또는 제대 줄기세포(UC), 양막-융모막 태반 줄기세포(AC) 혹은 BM-MSC와 함께 배양하였다. 6일 동안의 공동 배양 후 살아 있는 AAD⁻ 세포의 수를 매 공동 배양별로 측정하였다. B: 태반 줄기세포에 의한 종양 세포 억제의 시간 진행. MEG-01 세포를 단독으로 또는 사람 제대 정맥 내피 세포(HUVEC), BM-MSC 혹은 태반 줄기세포(PDAC)와 함께 배양하였다. 아넥신 V(annexin V)⁻이고 7-AAD⁻인 살아 있는 세포 수를 공동 배양 개시 후 1, 2, 3, 4와 6일째에 각 배양별로 측정하였다.
- [0238] 도 17. 태반 줄기세포의 MEG-01 종양 세포 억제에 있어서의 접촉 의존성. MEG-01/제대 줄기세포 공동 배양에서 얻은 조건 배지는 거핵모세포 백혈병 세포주(MEG-01)의 종양 성장을 억제한다. MEG-01 세포를 단독으로 배양, 또는 제대 줄기세포와 직접 공동 배양(MEG/UC), 또는 억제된 MEG-01/제대 줄기세포 공동 배양물(UC), MEG-01/골수 유래 중간엽 줄기세포 공동 배양물(BM) 또는 MEG-01/HUVEC 공동 배양물(H)로부터 수확한 조건 배지(1:2 또는 1:10 비율로 분할) 속에서 배양하였다. 6일 동안의 공동 배양 후, 살아 있는 세포(아넥신 V⁻, 7-AAD⁻) 수를 측정하였다.
- [0239] 도 18. MEG-01/태반 줄기세포 공동 배양물의 사이토킨 분비 경향. MEG-01, 태반 줄기세포(PDAC), BM-MSC와 HUVEC 세포를 단독으로 배양, 또는 다음 조합으로 공동 배양하였다: MEG-01/HUVEC, MEG-01/BM-MSC 또는 MEG-01/PDAC. 7일째 배양물의 상층액을 수확한 다음 Luminex로 혈소판 유래 성장 인자 AA(PDGF-AA), 과립구-단핵구 콜로니 자극 인자(granulocyte-monocyte colony stimulating factor, GM-CSF), 성장 관련 종양유전자-알파(growth-related oncogen α, GRO α)와 백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor, LIF) 분비를 분석하였다. 분비량은 pg/mL 단위로 나타내었다.
- [0240] 도 19. 베림질 세포 유래 인자 1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)에 대응한 제대 줄기세포(UC1)의 이동. UC1 태반 줄기세포를 24시간 동안 무혈청 배지(기저) 속에서만, 또는 10% FBS, SDF-1 함유 배지, 또는 SDF-1과 CXCR4 억제제인 AMD3100 함유 배지에서 배양하였다. CYQUANT(등록상표) GR 염료를 이 세포에 가한 다음 형광 플레이트 판독기로 480 nm와 520 nm에서 형광을 측정하였다.

도면

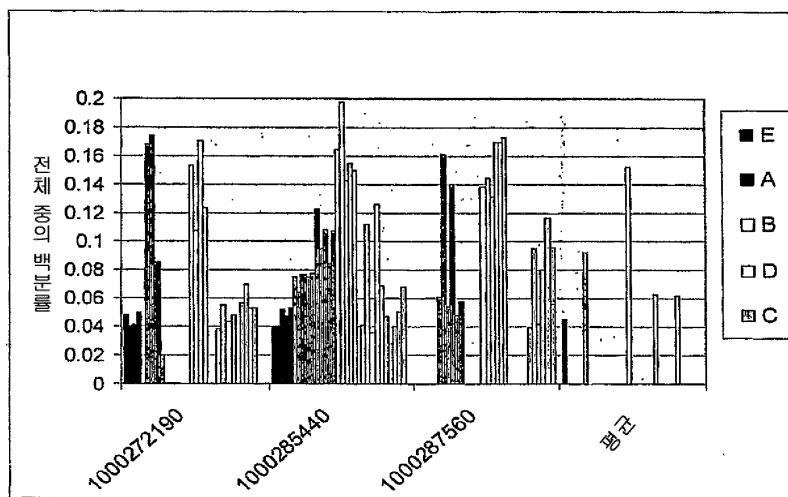
도면1



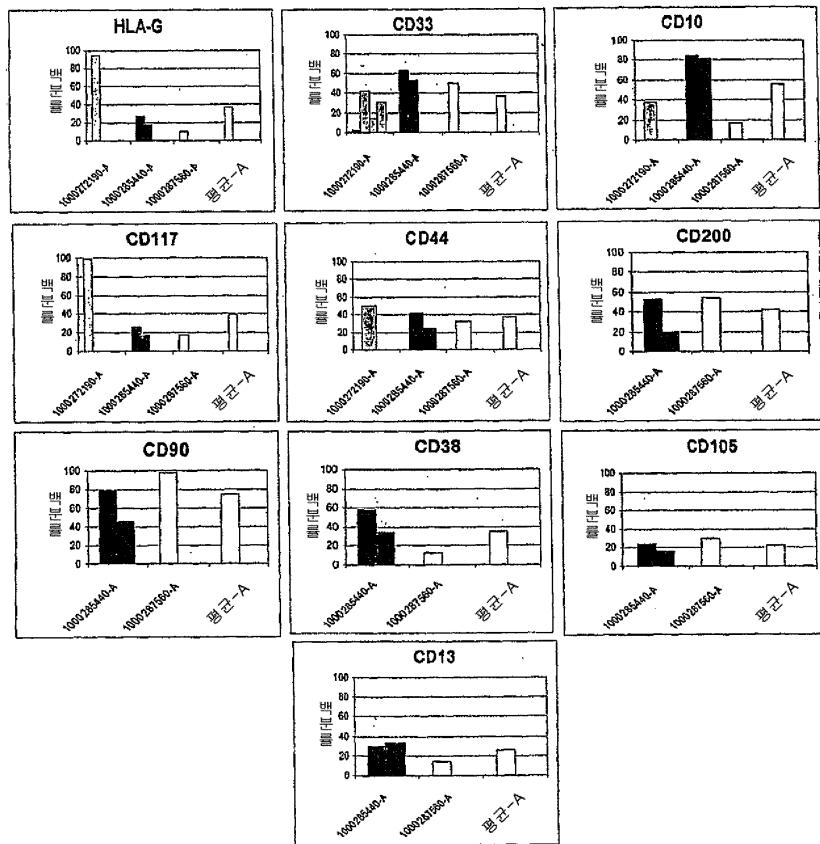
도면2



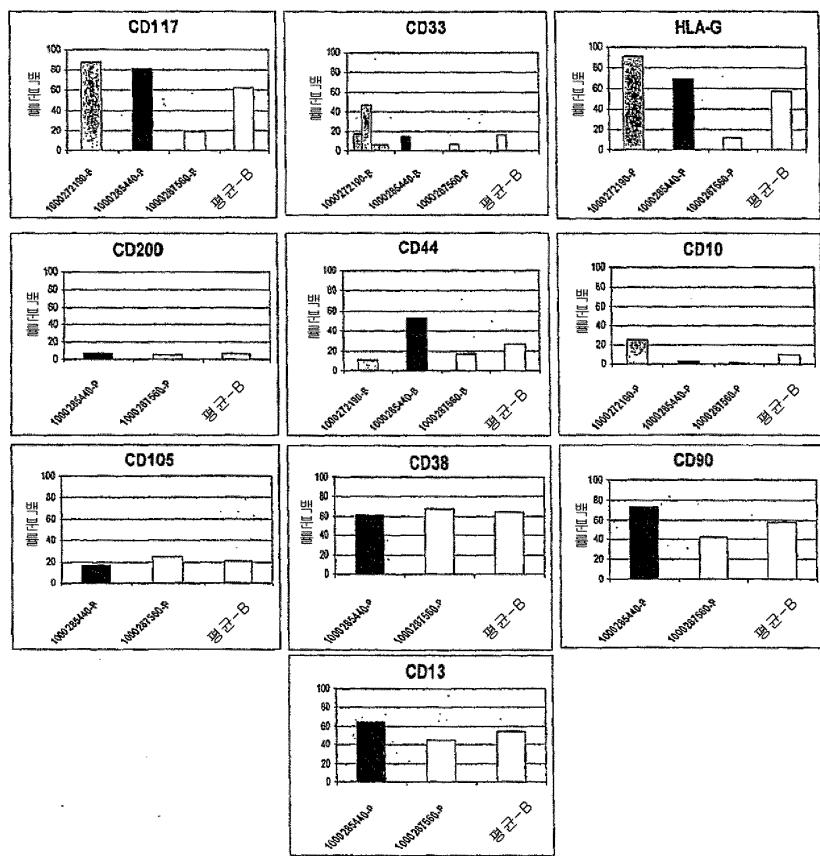
도면3



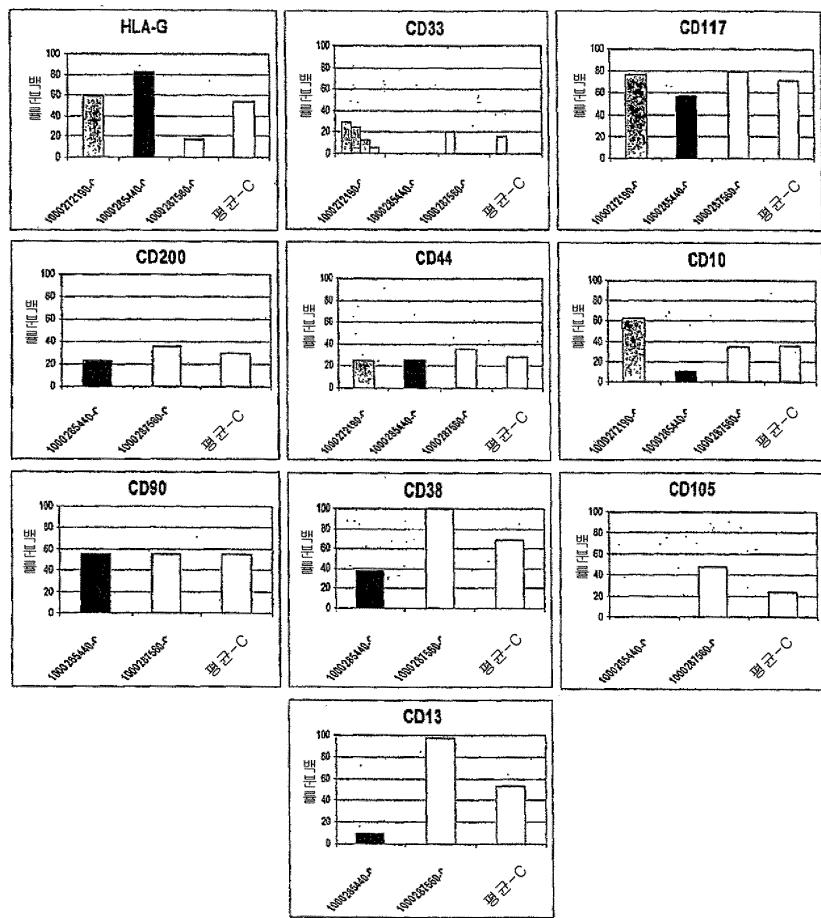
도면4



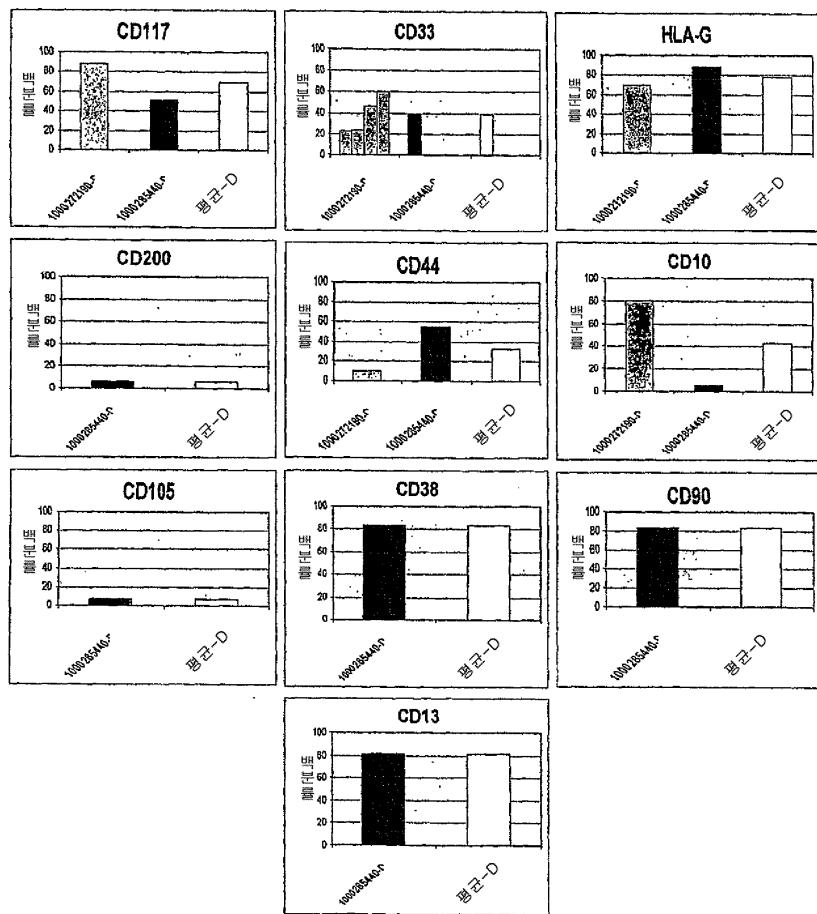
도면5



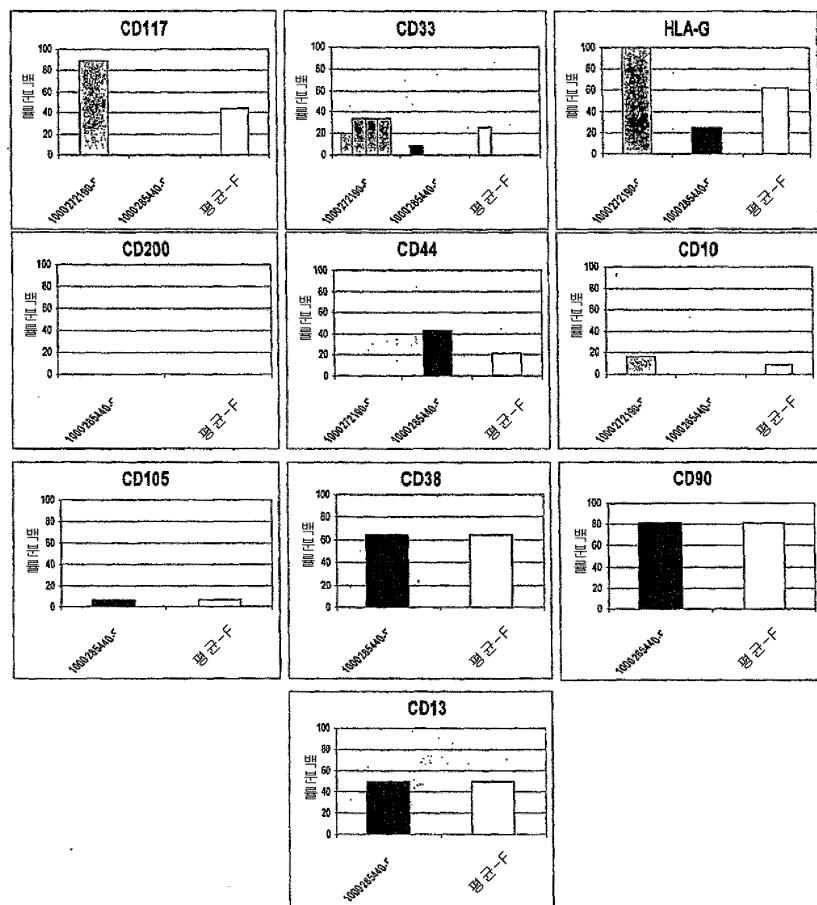
도면6



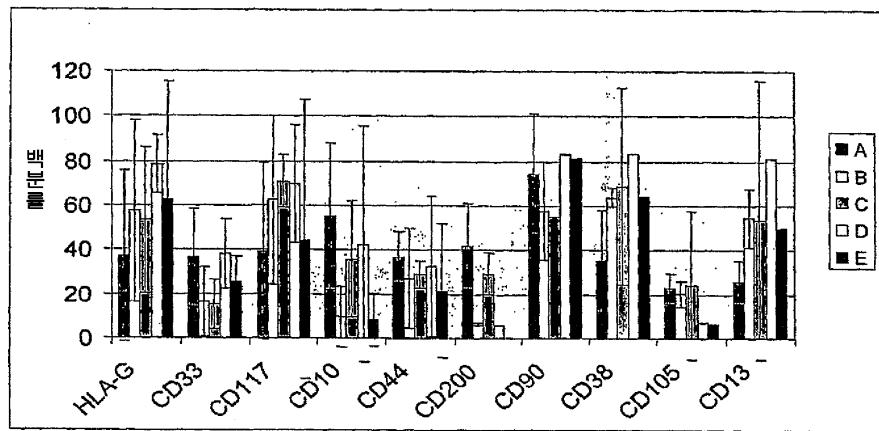
도면7



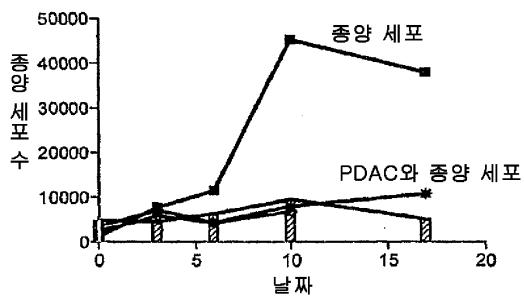
도면8



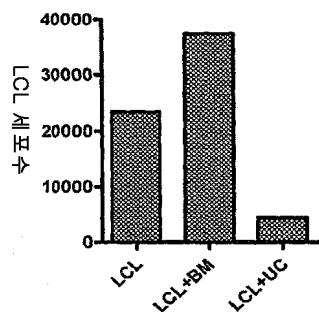
도면9



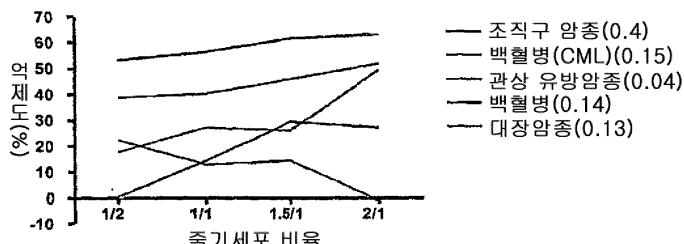
도면10



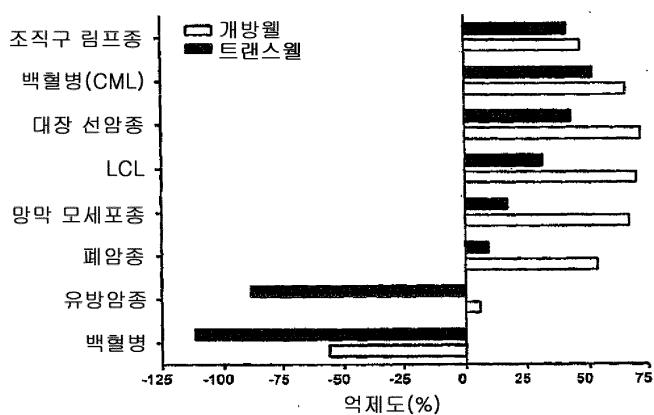
도면11



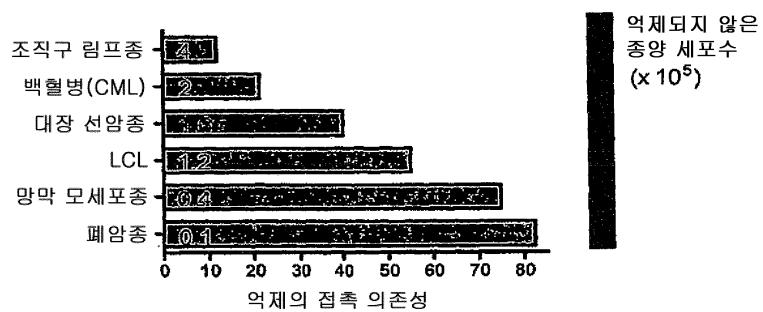
도면12



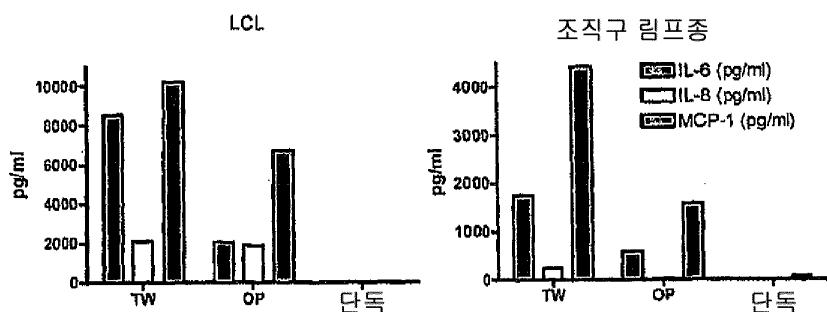
도면13A



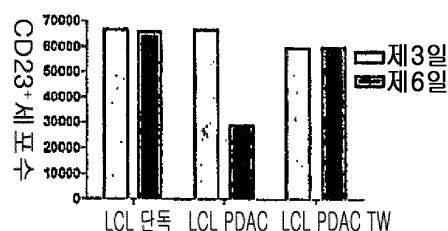
도면13B



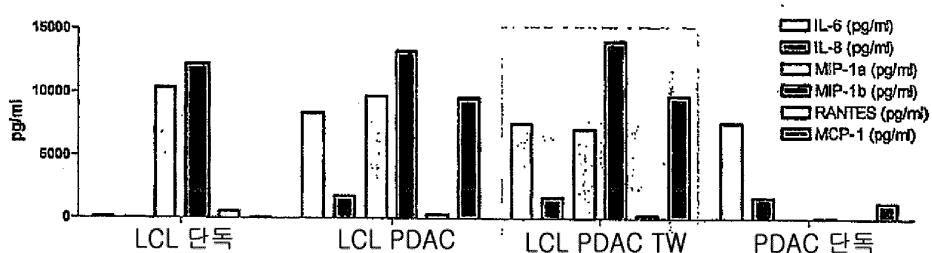
도면14



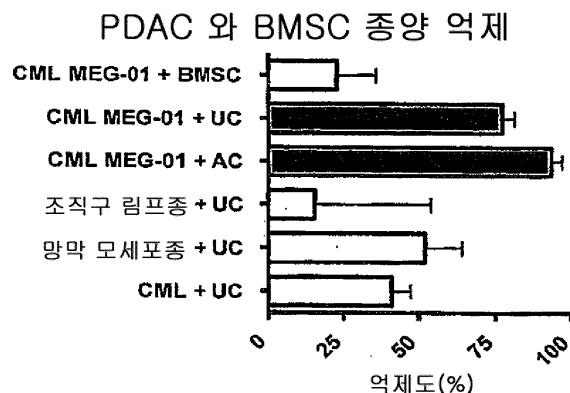
도면15A



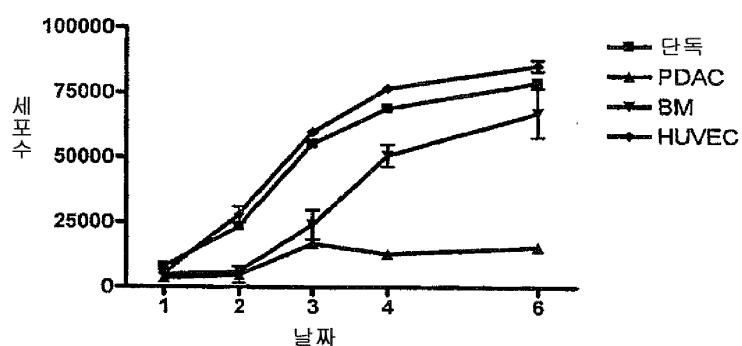
도면15B



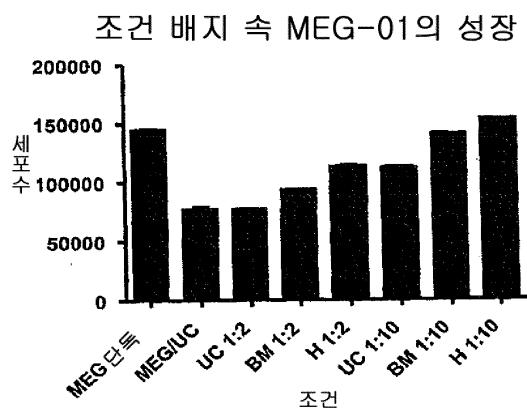
도면16A



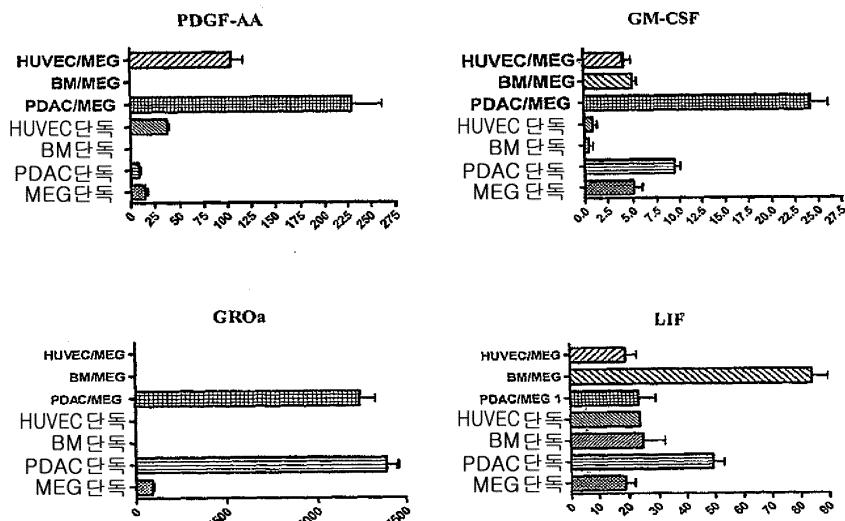
도면16B



도면17



도면18



도면19

