



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년08월22일
 (11) 등록번호 10-1176146
 (24) 등록일자 2012년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/07* (2010.01)
 (21) 출원번호 10-2004-7012604
 (22) 출원일자(국제) 2003년02월13일
 심사청구일자 2008년02월12일
 (85) 번역문제출일자 2004년08월13일
 (65) 공개번호 10-2004-0094426
 (43) 공개일자 2004년11월09일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2003/004539
 (87) 국제공개번호 WO 2003/068937
 국제공개일자 2003년08월21일
 (30) 우선권주장
 10/076,180 2002년02월13일 미국(US)
 60/437,292 2002년12월31일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Br. J. Haematol., 109:235.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
안트로제네시스 코포레이션
 미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
 (72) 발명자
하리리, 로버트제이.
 미국, 뉴저지주 07932, 플로햄파크, 헤리티지 로
 드 5
 (74) 대리인
특허법인필앤은지, 제갈혁, 구현서

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 **산후 포유류 태반으로부터 유래한 배아-유사 줄기 세포와 그 세포를 사용한 용도 및 치료방법**

(57) 요약

본 발명은 통상적인 코드 혈액 조성물 또는 다른 줄기 또는 전구 세포와 산후 태반으로부터 유래한 배아-유사 줄기 세포를 이용한 조성물 및 방법을 제공한다. 배아-유사 줄기 세포는 단독으로 사용되거나 다른 줄기 세포군과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 배아-유사 줄기 세포는 탯줄 혈액, 태아 및 신생아 조혈 줄기 세포 및 전구 세포, 골수에서 유래한 인간 줄기 세포 및 전구 세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 다른 줄기 세포군과 혼합될 수 있다. 배아-유사 줄기 세포 및 배아-유사 줄기 세포와 줄기 세포의 혼합군은 이식을 위한 치료적 용도, 질병의 치료 및 예방, 및 진단학적 및 연구 용도를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 용도와 적용을 가진다.

특허청구의 범위

청구항 1

사람 조혈(hematopoietic) 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 및

OCT-4⁺, ABC-p⁺, SSEA3⁻ 및 SSEA4⁻ 인 특성을 가지는 분리된 사람 태반 줄기세포(isolated placental stem cell)를 포함하는 조성물로서,

상기 태반 줄기세포는 탯줄 혈액(cord blood)을 배수하고, 잔류 혈액을 관류하여 제거한 태반에서 얻는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

사람 조혈(hematopoietic) 탯줄 혈액(cord blood) 줄기세포 또는 전구세포(progenitor cell) 및

OCT-4⁺, ABC-p⁺, SSEA3⁻ 및 SSEA4⁻ 인 특성을 가지는 분리된 사람 태반 줄기세포(isolated placental stem cell)를 포함하는 조성물로서,

상기 태반 줄기세포는 탯줄 혈액(cord blood)을 배수하고, 잔류 혈액을 관류하여 제거한 태반에서 얻는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 용기 안에 포함된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 용기는 밀봉되고, 공기 밀폐(air tight)되며, 살균(sterile)된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 줄기세포 또는 전구세포는 탯줄 혈액 또는 태반 혈액, 태아 또는 신생아 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 성체 세포 또는 골수 줄기세포 또는 골수 전구세포로부터 유래한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 줄기세포 또는 전구세포는 태아 또는 신생아 조혈 줄기세포 또는 전구세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 복수의 세포가 CD34⁺ 및 CD38⁻인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 탯줄 혈액 줄기세포는 복수의 세포가 CD34⁺ 및 CD38⁺인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

첫째 용기에는 사람 조혈(hematopoietic) 줄기세포 또는 전구세포를 포함하고,

둘째 용기에는 탯줄 혈액을 배수하고, 잔류 혈액을 관류하여 제거한 태반에서 얻는, 분리된 사람 태반 줄기세포 (isolated placental stem cell)를 포함하는 키트로서,

제 1항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 12

첫째 용기에는 사람 조혈(hematopoietic) 탯줄 혈액 세포를 포함하고,

둘째 용기에는 탯줄 혈액을 배수하고, 잔류 혈액을 관류하여 제거한 태반에서 얻는, 분리된 사람 태반 줄기세포 를 포함하는 키트로서,

제 2항의 조성물을 포함하는 키트.

청구항 13

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 태반 줄기세포의 수 및

상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포의 수는

적어도 1:1의 비율로 존재하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

복수의 조혈 톳줄 혈액 세포와 복수의 OCT-4⁺, ABC-p⁺, SSEA3⁻ 및 SSEA4⁻인 태반 줄기세포를 포함하되, 이들 세포를 각각 별도의 용기에 담고 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 41

삭제

청구항 42

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 적어도 5×10^9 개의 분리된 유핵 세포들을 함유하고, 상기 적어도 5×10^9 개의 분리된 유핵 세포들은 상기 OCT-4⁺, ABC-p⁺, SSEA3⁻ 및 SSEA4⁻인 태반 줄기세포들을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 43

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물 속의 세포는 적어도 30%가 태반 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 44

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물 속의 세포는 적어도 60%가 태반 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 45

제 42항에 있어서,

상기 적어도 5×10^9 개의 분리된 유핵 세포들은 복수의 공여자(donor)로부터 받은 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

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

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

- 삭제
- 청구항 100
- 삭제
- 청구항 101
- 삭제
- 청구항 102
- 삭제
- 청구항 103
- 삭제
- 청구항 104
- 삭제
- 청구항 105
- 삭제
- 청구항 106
- 삭제
- 청구항 107
- 삭제
- 청구항 108
- 삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 종래의 제대혈 조성물 또는 다른 줄기 또는 전구(progenitor) 세포들과 산후 태반으로부터 유래한 배아-유사(embryonic-like) 줄기 세포의 사용에 관한 것이다. 배아-유사 줄기 세포는 단독으로 또는 다른 줄기 세포 군(population)들과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 배아-유사 줄기 세포는 예를 들어, 하지만 이에 한정되지는 않는, 탯줄 혈액, 태아 및 신생아 조혈(hematopoietic) 줄기 세포 및 전구 세포, 골수로부터 유도된 인간 줄기 세포 및 전구세포 등과 같은 다른 줄기 세포군들과 혼합될 수도 있다. 배아-유사 줄기 세포 및 배아-유사 줄기 세포와 줄기 세포의 혼합 군은 예를 들어, 하지만 이에 한정되지 않는, 이식을 위한 치료용도, 진단용도 및 연구용도와 같은 다양한 용도 및 적응증을 갖는다. 배아-유사 줄기 세포 및 혼합 군은 또한 예를 들어, 하지만 이에 한정되지 않는, 혈관질환, 신경질환 또는 장애, 자가면역 질환 또는 장애, 염증을 포함하는 질병 또는 이상 및 암 또는 이와 관련된 장애와 같은 질병 또는 이상의 치료에 유용하다. 특히, 배아-유사 줄기 세포 또는 그것을 포함하는 혼합물은 HLA 타이핑 없이 고용량으로 투여된다.

배경기술

[0002] 인간 줄기 세포의 식별, 분리 및 발생에 관하여 상당한 관심이 집중되어 있다. 인간 줄기 세포는 다양한 성숙 인간 세포들을 형성할 수 있는 전능성(全能性 totipotent) 또는 다능성(多能性 pluripotent) 전구 세포들이다. 이러한 능력은 조직 및 장기 형성을 위해 필요한 세포적 분화 및 전문화(specialization)를 위한 기초로 작용한다.

[0003] 최근 그러한 줄기 세포의 이식 성공은 질병 및 독성물질 및/또는 방사선 노출 후에 골수를 재구성 및/또는 보충

하는 새로운 임상적 도구를 제공해 왔다. 줄기 세포가, 비록 모든 조직은 아니지만, 많은 조직들을 복원시키고, 생리적이고 해부학적인 기능을 회복시키기 위해 적용될 수 있다는 또 다른 증거들이 존재한다. 조직 공학, 유전자 치료 전달 및 세포 치료학에서의 줄기 세포의 적용 또한 빠르게 발전하고 있다.

[0004] 포유류 줄기 세포의 많은 다른 타입들이 특징지어져 왔다. 예를 들어 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 성인 줄기 세포 또는 다른 수임 세포(committed cell) 또는 전구 세포들이 알려져 있다. 일정 줄기 세포들은 분리되고 특징화되었을 뿐만 아니라 어느 정도까지 분화 가능한 조건 하에서 배양되어 왔다. 그러나 모든 세포 타입으로 분화 가능한 인간 줄기 세포의 충분한 양 및 일군을 얻는 것이 거의 불가능한 것과 같은 기본적인 문제점이 남아 있다. 줄기 세포는 심각하게 불충분하다. 이점은 악성 종양, 유전적 대사 장애, 혈액소병증 및 면역결핍과 같은 다양한 이상들을 치료하는데 중요한 사항이다. 더 많은 배아 줄기 세포의 공급원을 가지는 것은 매우 유리할 것이다.

[0005] 많은 이유로 인해 충분한 수의 인간 줄기 세포를 얻는 것이 문제가 되어 왔다. 첫 번째로 성인 조직에서 일반적으로 생기는 일군의 줄기 세포의 분리는, 부분적으로, 혈액 또는 조직에서 발견되는 양이 매우 제한적이기 때문에 기술적으로 어렵고 많은 비용이 든다. 두 번째로 낙태아사용을 포함한 배아 또는 태아 조직으로부터 이러한 세포들의 획득은 종교적이고 윤리적인 우려를 야기하여 왔다. 널리 받아들여지고 있는, 인간 배아 및 태아가 독립적인 생명체라는 믿음은 의학적 연구를 포함한 모든 목적을 위하여 그러한 공급원의 사용에 대한 정부적 억제를 촉발하여 왔다. 그러므로 배아 또는 태아 조직으로부터 얻어진 세포의 사용이 필요치 않은 대안적 공급원이 임상적으로 줄기 세포의 사용을 진전시키기 위해 필수적이다. 그러나 줄기 세포 특히 인간 줄기 세포의 실용적인 대안적 공급원이 거의 없고 그 공급 또한 제한적이다. 게다가 대안적 공급원에서 기원한 줄기 세포를 충분한 양만큼 확보하는 것은 일반적으로 많은 노동을 필요로 한다. 예를 들어 그러한 노동은 공여자 또는 환자로부터 세포 또는 조직의 확보, 시험관(*in vitro*) 배양 및/또는 증식, 해부 등의 일을 포함한다.

[0006] 예를 들어 Caplan 등(미국특허 제5,486,359호, "인간 중간엽 줄기 세포", 1996년 1월 23일 발행)은 중간엽 세포 계통(lineage)의 전구체로 작용할 수 있는 골수로부터 유래된 인간 중간엽 줄기 세포(human mesenchymal stem cell, hMSC) 조성물을 개시하고 있다. Caplan 등은 hMSC가 모노클로날 항체로 식별되는 특이 세포 표면 마커에 의해 식별될 수 있다고 개시하였다. 상동적 hMSC 조성물은 조혈 세포 또는 분화된 중간엽 세포와 관련된 마커가 없는 부착 골수(adherent marrow) 또는 골막 세포(perosteal cell)의 양성적 선택에 의해 얻어진다. 이러한 분리된 중간엽 세포군은 중간엽 줄기 세포와 관련된 항원결정인자적인(epitopic) 특성을 나타내고, 배양 시 분화 없이 재생성할 수 있는 능력을 가지며, 손상 조직 부위에 *in vivo*적으로 놓여지거나 *in vitro*로 유도될 때 특이 중간엽 계통(lineage)으로 분화할 수 있는 능력을 가진다. 그러나 그러한 방법들의 결점은 그 방법들이 공여자로부터 골수 또는 골막 세포의 확보, 및 그것으로부터 MSC의 계속적 분리가 필요하다는 점이다.

[0007] Hu 등(PCT특허 제00/73421호, "인간 양막(amniotic) 상피 세포의 분리방법, 저온보존방법 및 치료학적 용도", 2000년 12월 7일 발행)은 분만 시 태반으로부터 얻어진 인간 양막 상피 세포를 분리하고, 배양하고, 미래의 사용을 위해 저온보존하고(cryopreserved), 또는 분화 유도하는 것을 개시하고 있다. Hu 등에 따르면 분만 후 즉시 태반이 확보되고, 양막이 융모막(chorion)으로부터 절개 등에 의하여 분리된다. 양막 상피 세포는 표준적인 세포 분리 기술에 의하여 양막으로부터 분리된다. 개시된 세포는 다양한 매질에서 배양될 수 있고, 배양으로 확장될 수도 있으며, 저온보존될 수 있고, 또는 분화하도록 유도될 수 있다. Hu 등은 양막 상피 세포들이 멀티포텐셜(multipotential) (및 가능하게 플러리포텐셜한(pluripotential))하고, 각막 표면 상피 세포 또는 질 상피 세포와 같은 상피 조직으로 분화할 수 있다는 사실을 개시하고 있다. 그러나 그러한 방법들의 단점은 그 방법들이 노동 집약적이고, 줄기 세포의 제조량이 매우 낮다는 점이다. 예를 들어 통상적인 치료 또는 연구 목적을 위하여 충분한 수의 줄기 세포를 얻기 위해서는 먼저 양막으로부터 절개 및 세포 분리 기술에 의하여 양막 상피 세포가 분리되어야 하고, 그 후 배양되고 *in vitro*에서 증폭되어야 한다.

[0008] 탯줄 혈액(Umbilical cord blood, 코드 혈액(cord blood))은 잘 알려진 조혈 전구 줄기 세포의 대안적 공급원이다. 코드 혈액의 줄기 세포는 통상적으로 조혈 재구성(hematopoietic reconstitution)의 용도를 위하여 저온보존되고, 골수 및 다른 관련 이식에서 사용되는 치료적 절차에서 널리 사용 된다 (Boyse 등, 미국특허 제5,004,681호, "혈액의 태아 및 신생아의 조혈 줄기 및 전구 세포의 보존"; Boyse 등, 미국특허 제5,192,553호, "혈액의 태아 및 신생아 조혈 줄기 및 전구 세포의 분리 및 보존과 치료학적 사용방법", 1993년 3월 9일 발행 참조). 코드 혈액의 모집을 위한 통상적인 기술은 바늘(needle) 또는 캐눌러(cannula)의 사용에 기초하는데, 그것은 예를 들어 방혈(혈액제거, exsanguinate)과 같이 태반으로부터 코드 혈액을 빼기 위하여 중력의 도움을 이용한다 (Boyse 등, 미국특허 제5,192,553호, 1993년 3월 9일 발행; Boyse 등, 미국특허 제5,004,681호, 1991년 4월 2일 발행; Anderson, 미국특허 제5,372,581호, "태반 혈액 모집을 위한 방법 및 도구", 1994년 12월 13일

발행; Hessel 등, 미국특허 제5,415,665호, "탯줄 클램핑(clamping), 컷팅(cutting), 및 혈액 모집 기구 및 방법, 1995년 5월 16일 발행). 바늘 또는 캐놀러는 일반적으로 탯줄 정맥에 위치하고, 태반은 태반으로부터 코드 혈액이 뽑아지는 것을 도와주기 위하여 부드럽게 마사지된다. 그 후 혈액이 뽑아진 태반은 더 이상의 효용성이 없는 것으로 여겨졌고 일반적으로 버려졌다. 또한 코드 혈액으로부터 줄기 세포 확보하는데 있어 주된 한계는 얻어진 코드 혈액의 불충분한 양이었다. 이것은 이식 후에 효과적으로 골수를 재구성하기에 불충분한 세포 수이다.

[0009] Naughton 등(미국특허 제5,962,325호, "3차원적 기질(stromal) 조직 배양", 1999년 10월 5일 발행)은 섬유아세포-유사 세포 및 연골세포-전구체를 포함하는 태아 세포가 탯줄 또는 태반 조직 또는 탯줄 혈액으로부터 얻어질 수도 있다고 개시하였다.

[0010] Kraus 등(미국특허 제6,338,942호, "타겟 세포 군의 선택적 증폭", 2002년 1월 15일 발행)은 성장 매질에서 다른 세포로부터 미리 결정된 타겟 세포군을 선택하기 위하여, 코드 혈액 또는 말초 혈액의 시작 샘플 세포를 성장 매질에 도입하고, 타겟 세포군의 세포를 분할하도록 유도하고, 성장 매질 안의 세포를 미리 결정된 세포군(CD34 세포와 같은)에 대해 특이 친화력을 가진 결합 분자(CD34에 대한 모노클로날 항체와 같은)를 포함하는 선택 인자와 접촉하도록 함으로써 미리 결정된 타겟 세포군을 선택적으로 증폭할 수도 있다는 사실을 개시하였다.

[0011] Rodgers 등(미국특허 제6,335,195호, "조혈 및 중간엽 세포 증식 및 분화를 촉진하는 방법", 2002년 1월 1일 발행)은 조혈 및 중간엽 줄기 세포의 *ex vivo* 배양방법 및 안지오펜시노겐(angiotensinogen), 안지오펜신 I(AI), AI 유사체(analogue), AI 단편(fragment) 및 그들의 유사체, 안지오펜신 II(AII), AII 유사체, AII 단편 또는 그들의 유사체 또는 AII AT₂ 타입 2 수용체 작용제(agonist)의 존재 하에서, 단독으로 또는 다른 성장 인자 및 시토키인과 함께, 배양함으로써 계통(lineage)-특이적 세포의 증식 및 분화를 유도하는 방법을 개시하였다. 줄기 세포는 골수, 말초 혈액 또는 탯줄 혈액으로부터 얻어 졌다. 그러나 이러한 방법들의 단점은 줄기 세포의 증식 및 분화를 유도하기 위한 그러한 *ex vivo* 방법들이 전술한 바와 같이 많은 시간이 필요하고, 또 줄기 세포의 생산성이 낮다는 점이다.

[0012] 줄기 세포의 수집 및 사용에 대한 제약들과 코드 혈액으로부터 일반적으로 수집된 불충분한 세포 수 때문에, 줄기 세포는 결정적으로 공급이 부족하다. 줄기 세포는 악성 종양, 유전적 대사 장애, 혈액소병증 및 면역결핍을 포함하는 다양한 이상의 치료에 사용될 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 다양한 치료학적 목적 및 다른 의학적으로 관련된 목적을 위하여 많은 수의 인간 줄기 세포를 용이하게 얻을 수 있는 공급원에 대한 결정적 필요성이 존재해 왔다. 본 발명은 그 필요성 및 다른 것에 대해 언급한다.

[0013] 부가적으로 신경 위축성 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 신경학적 병태의 치료를 위한 필요성도 존재한다. 비록 덜 일반적인 형태의 ALS인 가계적(familial) ALS를 가진 조사받은(irradiated) 생쥐 모델을 사용한 최근의 연구가 코드 혈액이 이러한 질환의 치료에 유용하다는 것을 제안하였지만, 전술한 공급원에 대한 이슈는 이러한 옵션을 이상적인 것에 지나지 않게 만든다. 이에 관해서는 Ende 등, Life Sci. 67: 53059 (2000)를 참조하시 바란다. 따라서 질병의 치료에 사용될 수 있는 줄기 또는 전구 세포군, 특히 ALS와 같은 질병을 치료 시 보다 많은 양의 이러한 군들에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 상세한 설명

[0014] **발명의 요약**

[0015] 본 발명은 코드 혈액 조성물 또는 그것에서 기인한 줄기 또는 전구 세포에 관한 것으로 상기 조성물은 산후(post-partum) 태반에서 유래한 배아-유사 줄기 세포로 보충되거나 배아-유사 줄기 세포와 접촉된다. 다른 적용들의 대상인 배아-유사 줄기 세포는 본 명세서에서 조성물 또는 다른 줄기 또는 전구 세포군들과의 혼합물로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 배아-유사 줄기 세포는 탯줄 혈액, 태아 및 신생아 조혈 줄기 세포 및 전구 세포, 골수에서 유래한 인간 줄기 세포 및 전구 세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 다른 줄기 또는 전구 세포군들과 접촉될 수도 있다. 배아-유사 줄기 세포 및 배아-유사 줄기 세포와 줄기 또는 전구 세포의 혼합군은 이식을 위한 치료적 사용, 질병의 치료 및 예방, 및 진단학적 및 연구적 용도와 같은, 하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 용도 및 적용증(application)을 갖는다.

[0016] 본 발명에 따르면, 일군의 줄기 세포는 줄기 세포군에서 다능성(pluripotent) 및 중복성(multipotent) 줄기 세포의 농도를 보충, 보강 또는 증가하기 위하여 일군(population)의 배아-유사 줄기 세포와 혼합된다. 예를 들어, 일 실시예에서, 탯줄 혈액, 또는 그것에서 유래한 줄기 또는 전구 세포는 환자에게 투여 전에 본 발명의

배아-유사 줄기 세포로 보강되거나 배아-유사 줄기 세포와 접촉한다. 배아-유사 줄기 세포는 탯줄 혈액, 또는 그것으로부터 유래한 세포들과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수도 있다는 것을 인식하여야 한다. 그러나 투여 전에 각각의 세포를 접촉하는 것이 바람직하다.

- [0017] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포는 CD10, CD29, CD44, CD54, CD90, SH2, SH3, SH4, OCT-4 및 ABC-p의 세포 표면 마커들의 존재와 CD34, CD38, CD45, SSEA3 및 SSEA4의 세포 표면 마커들의 부존재에 의하여 특징화될 수 있다. 바람직한 일 실시예에서, 그러한 배아-유사 줄기 세포는 세포 표면 마커 OCT-4와 APC-p의 존재에 의하여 특징화될 수 있다. 태반으로부터 유래한 배아-유사 줄기 세포는 배아 줄기 세포의 특성을 가지고 있지만 배아로부터 유래하지는 않는다. 즉, 본 발명은 코드 혈액과 OCT-4+ 및/또는 ABC-p+인 태반으로부터 분리된 배아-유사 줄기 세포의 혼합물을 포함한다. 그러한 배아-유사 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포와 같이 다양한 재능(예를 들어 다능성)을 가지고 있다.
- [0018] 본 발명에 따르면, 일군의 줄기 세포는 플러리포텐트 또는 멀티포텐트인 배아-유사 줄기 세포와 혼합된다. 그러한 배아-유사 줄기 세포는 매 다른 시점마다 예를 들어 CD34+/CD38+, CD34+/CD38-, 및 CD34-/CD38- 조혈 세포와 같이 관류되는 태반으로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 그러한 세포는 본 발명의 방법에 따라서 탯줄 혈액에서 발견되는 것과 같은 일군의 조혈 줄기 세포를 보충하기 위해 사용될 수도 있다.
- [0019] 본 발명은 또한 하나의 백(bag) 또는 컨테이너(container)안에 배아-유사 줄기 세포와 줄기 세포의 혼합물이 함유된 조성물을 제공한다. 바람직한 일 실시예에서, 조성물은 약학적으로 허용되는 단일 투여량 조성물이다. 다른 일 실시예에서, 본 발명은 일군의 줄기 세포와 일군의 배아-유사 줄기 세포가 두개의 분리된 백 또는 컨테이너에 포함된 조성물을 제공한다. 일정 실시예에서, 그러한 "두개의 백" 키트는 그것이 필요한 환자에게 투여 시에 또는 투여 전에, 특히 투여 직전에, 혼합될 수도 있다. 다른 실시예에서, 각 백의 내용물은 환자에게 분리되어 투여될 수도 있는데, 여기에서 두 세포군의 혼합이 *in vivo*에서 발생한다. 다른 실시예에서, 컨테이너는 밀봉되고, 공기흐름이 차단되고, 및 멸균된다.
- [0020] 본 발명은 배아-유사 줄기 세포와 혼합되는 일군의 줄기 세포에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 배아-유사 줄기 세포와 혼합될 수 있는 줄기 세포는 탯줄 혈액, 태아 및 신생아 조혈 줄기 세포 및 전구 세포, 골수에서 유래한 인간 줄기 세포 및 전구 세포를 포함한다. 하지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포는 탯줄 혈액과 혼합된다.
- [0021] 본 발명은 또한 배아-유사 줄기 세포로 보충된 일군의 줄기 세포를 투여함으로써 그것일 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은 환자에게 결합된 또는 "스파이크된" 일군(spiked population)의 투여 전에 배아-유사 줄기 세포와 줄기 세포를 혼합함으로써 발생한다. 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 줄기 세포를 보충하는 것은, 배아-유사 줄기 세포와 코드 혈액 세포의 동시 투여하는 것과 같이, 환자에게 보충된 일군을 투여함으로써 발생한다. 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 줄기 세포를 보충하는 것은, 줄기 세포의 투여 전 또는 투여 후에 줄기 세포로부터 분리된 배아-유사 줄기 세포를 투여하는 것과 같이, 환자에게 코드 혈액 세포의 투여 후에 발생한다.
- [0022] 본 발명에 따르면, 태반과 같은 배아-유사 줄기 세포로 보충된, 예를 들어 탯줄 혈액과 같은, 일군의 줄기 세포는 예방적, 치료적 및 진단적 용도를 포함하는 다양한 용도를 가진다. 보충된 일군의 줄기 세포는 이식 및/또는 질병을 예방 또는 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 보충된 일군의 세포는 조직 및 장기를 회복하고 재구성하기 위하여 사용될 수 있는데, 그것에 의하여 질병이 있는 조직, 장기 또는 그들의 일부분을 대체하거나 수복한다. 다른 실시예에서, 보충된 일군의 줄기 세포는 특정 질환 또는 이상에 대한 전처리(predisposition) 또는 유전적 이상을 검사하기 위한 진단제로 사용될 수 있다.
- [0023] 다른 실시예에서, 본 발명은 혈액이 제거된 태반의 추출물 또는 관류액(perfusate)으로부터 다른 배아-유사 및/또는 멀티포텐트 또는 플러리포텐트한 줄기 세포를 분리하는 방법과 본 발명에 따라서 일군의 코드 혈액 세포를 보충하기 위하여 그것을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한 여러 줄기 세포군, 예를 들어 탯줄 혈액 세포군을 포함하는 약학적 조성물로서, 하나 이상의 본 발명의 배아-유사 줄기 세포군으로 보충된 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 모든 세포 타입으로 분화될 수 있는 잠재력을 가진 분리된 균질적인(homogeneous) 인간 태반 줄기 세포군을 제공한다. 다른 실시예에서, 일군의 인간 태반 줄기 세포는 한 가지 세포 타입으로 분화될 수 있는 잠재력을 가진다. 또 다른 실시예에서, 일군의 인간 태반 줄기 세포는 여러 가지 다른 세포 타입으로 분화될 수 있

는 잠재력을 가진다. 그러한 세포는 본 발명의 방법에 따라서 탯줄 혈액과 같은 줄기 세포군들을 보충하기 위하여 사용될 수도 있다.

[0026] 본 발명은 또한 고농도(또는 더 크기가 큰 세포군)의 균일한 조혈 줄기 세포를 가지는 세포군 하나 또는 그 이상으로 보충된 조혈 줄기세포군들을 포함하는 약학적 조성물도 망라하고 있는데, 상기 균일한 조혈 줄기세포에는 CD34+/CD38- 세포; CD34-/CD38- 세포, 및 CD133+ 세포가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 하나 이상의 이러한 세포군은 이식 및 다른 용도를 위하여 탯줄 혈액 또는 다른 공급원으로부터 얻어진 CD34+/CD38+ 조혈 세포와 같은 조혈 줄기 세포와 함께 사용되거나, 또는 혼합될 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한, 저장된 또는 저온보관된 코드 혈액 세포를 포함하는, 일군의 줄기, 전구 또는 코드 혈액 세포를 일군의 배아-유사 줄기 세포와 혼합하는 방법을 제공한다. 일실시예에서, 두개의 군이 물리적으로 혼합된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 두개의 군은 물리적으로 혼합되고 그 후 세포분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 모든 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 줄기 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포는 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리되고, 그 후 물리적으로 혼합된다. 일실시예에서, 혼합된 군은 다양한 세포 타입으로의 분화를 유도하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 다른 실시예에서 혼합된 군은 하나의 특정 세포 타입으로의 분화를 유도하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 다른 실시예에서 혼합된 군은 하나의 특정 세포 타입으로의 분화를 막거나 억제하기 위하여 성장인자로 처리된다. 일정 실시예에서, 배양 상태는 조절될 수 있는데, 예를 들어 세포의 혼합군은 특정 세포 타입으로 분화를 유도하거나 연결시키기 위하여 특정 시토카인 또는 인터루킨 혼합물로 처리될 수도 있다.

[0028] 다른 실시예에서, 본 발명은 복수개의 탯줄 혈액 세포와 복수개의 배아-유사 줄기 세포를 투여하는 것을 포함하는, 그것이 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0029] 다른 실시예에서, 본 발명은 그것이 필요한 환자에게 탯줄 혈액 세포 (또는 그것으로부터 분리된 줄기 세포)와 배아-유사 줄기 세포를 투여하는 것을 포함하는, 척수형성이상증(myelodysplasia)를 치료하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명은 또한 인간 태반 줄기 세포 (배아-유사 줄기 세포)의 새로운 용도에 관한 것이다. 배아-유사 줄기 세포와 다른 줄기 또는 전구 세포 또는 그것의 공급원을 포함하는 조성물을 가지고 질병을 치료 또는 예방하는 방법 또한 본 발명에 포함된다. 유사하게, 그러한 조성물을 투여하는 방법도 포함된다. 최종적으로, 본 발명의 조성물은 여러 공여자로부터 유래된 줄기 또는 전구 세포군을 포함할 수 있음이 인식되어야 한다. 본 발명은 환자에서 HLA-매치 조성물 뿐만 아니라 비-HLA 매치(matched) 조성물의 용도도 포함한다. 일정 환자와 매칭하는 혈액 타입이 바람직하다. 하지만, 배아-유사 줄기 세포와 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 조성물이 사용될 때 반드시 요구되는 것은 아니다.

[0031] **용어의 정의**

[0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "바이오리액터(bioreactor)"는 세포를 증식시키거나, 생물학적 물질을 생산 또는 발현시키거나, 세포 조직, 오르가노이드(organoid), 바이러스, 단백질, 폴리뉴클레오티드 및 미생물을 배양 또는 성숙시킬 수 있는 생체 밖(ex vivo) 시스템을 말한다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "코드 혈액" 또는 "탯줄 혈액"은 혼용되어 사용될 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 용어 "배아 줄기 세포"는 예를 들어 4-5일 성숙된 인간 배아와 같은 포배(blastocyst)의 내부 세포 덩어리에서 유래된, 다능성(pluripotent) 세포를 말한다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어 "배아-유사 줄기 세포"는 포배낭의 내부 세포 덩어리에서 유래되지 않은 세포를 말한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "배아-유사 줄기 세포"는 "태반 줄기 세포"로 표현될 수도 있고, 바람직하게는 산후 관류된 태반으로부터 유래된 인간 태반 줄기 세포를 말한다. 배아-유사 줄기 세포는 바람직하게는 다능성(pluripotent)이다. 그러나 태반으로부터 얻어질 수도 있는 줄기 세포는 배아-유사 줄기 세포, 중복성(multipotent) 세포, 및 수임(committed) 전구 세포를 포함한다. 본 발명의 방법에 따르면, 태반으로부터 유래된 배아-유사 줄기 세포는 혈액이 제거되고 잔류 세포를 제거하기에 충분한 시간동안 관류된 분리된 태반으로부터 수집될 수도 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "혈액이 제거된" 또는 "혈액제거"(exsanguinated 또는 exsanguination)는 태반과 관련되어 사용될 때, 태반으로부터 모든 코드 혈액이 제거 및/또는 배수된 것을 말한다. 본 발명에 따르면, 태반의 혈액제거는 예를 들어, 하지만 이에 한정되지는 않는, 드레이닝(drainage), 중력 유도 유출(gravity induced

efflux), 마사지(massaging), 쥐어짜(squeezing), 펌핑(pumping) 등과 같은 방법들에 의하여 수행될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 태반의 혈액제거는 일정한 용액으로 태반을 관류(perfusing), 린싱(rinsing) 또는 수세(flushing)하여 수행될 수도 있다. 상기 용액은 태반의 혈액제거를 돕기 위한 항응고제와 같은 성분을 포함할 수도 또는 포함하지 않을 수도 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 용어 "혼합하다"는 하나의 덩어리 또는 혼합물로 결합시키거나 뒤섞는(blend) 것; 하나의 덩어리로 함께 놓아 구성 성분이 다소 균질해지도록 하는 것; 성분들을 결합하여 생성 또는 형성시키는 것; 혼합(admixture), 보충(supplementation), 또는 합침(commingling)하여 만드는 것; 또는 한 성분 또는 부분을 다른 성분 또는 부분에 첨가하는 것을 의미한다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 용어 "관류하다(perfuse)" 또는 "관류(perfusion)"는 장기 또는 조직을 통하여 또는 그 위로 용액을 분거나 통과시키는 행위를 말하는데, 바람직하게는 예를 들어 비-부착 세포와 같은 잔류 세포가 장기 또는 조직으로부터 제거되기에 충분한 압력 또는 힘으로 장기 또는 조직을 통하여 용액을 통과시키는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "관류액(perfusate)"은 장기 또는 조직을 통하여 통과한 후 수집된 액을 의미한다. 바람직한 실시예에서, 관류액은 하나 이상의 항응고제를 포함한다.

[0039] 본 명세서에서 사용된 용어 "외생(exogenous) 세포"는 "외래의(foreign)" 세포를 말한다. 즉, 태반 이외의 다른 조직 또는 장기로부터 기인한 이종 세포 (태반 공여자 이외의 공급원으로부터 유래된 "비-자가" 세포) 또는 자기 조직의 세포 (태반 공여자로부터 유래된 "자가" 세포)를 말한다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 용어 "오르가노이드(organoid)"란 포유류 신체, 바람직하기로는 인간 신체의 어떠한 장기 또는 선(gland)과 같이 겉모습 적으로 또는 실제 구조적으로 모여 있는 하나 이상의 세포 타입의 응집체를 말한다.

[0041] 본 명세서에서 사용된 용어 "중복성(multipotent)"이란 포유류 신체의 약 260개의 세포 타입 중 일정 수의 세포 타입으로 성장할 수 있는 능력을 가진 세포를 말한다. 다능성 세포와는 달리, 중복성 세포는 모든 세포 타입을 형성할 수 있는 능력이 없다.

[0042] 본 명세서에서 사용된 용어 "다능성(pluripotent)"은 세포의 완전한 분화 능력을 말한다. 즉, 포유류 신체의 약 260개의 세포 타입으로 성장할 수 있는 능력을 가진 세포를 말한다. 다능성 세포는 자가-신생이 가능하고, 조직 내에서 휴지 상태 또는 정지(침묵)상태로 존재할 수 있다. 전능성 세포(예를 들어 이배체 수정란 같은)와 달리, 배아 줄기 세포는 일반적으로 새로운 포배낭(blastocyst)을 형성할 수 없다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 용어 "전구 세포(progenitor cell)"는 특정 타입의 세포로 분화되도록 또는 특정 타입의 조직을 형성하도록 지정된 세포를 말한다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "줄기 세포"는 조직 및 장기의 특성화된 세포를 형성하도록 무한적으로 반복 생성될 수 있는 마스터 세포를 말한다. 줄기 세포는 발생학적으로 다능성 또는 중복성 세포이다. 줄기 세포는 두개의 딸 줄기 세포, 또는 하나의 딸 줄기 세포와 하나의 전구("전이(transit)") 세포를 생성하도록 분열할 수 있다. 그 후 하나의 전구 세포는 조직의 성숙한, 완전히 형성된 세포로 증식한다. 본 명세서에서 사용된 "줄기 세포"는 달리 표시되지 않는다면 전구 세포를 포함한다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "전능성(totipotent)"은 주머니배와 같은 완전한 배아를 형성할 수 있는 세포를 말한다.

[0046] **발명의 구체적 설명**

[0047] 본 발명은 부분적으로 혈액 제거된, 관류된 및/또는 배양된 태반에 의해 형성된 배아-유사 줄기 세포가 바람직한 세포 타입으로 쉽게 분화될 수 있는 플러리포텐트 줄기 세포라는 기대하지 못한 발견에 기인한다. 이러한 배아-유사 줄기 세포는 태줄 혈액, 태아 및 신생아 조혈 줄기 세포 및 전구 세포, 골수에서 유래한 인간 줄기 세포 및 전구 세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 일군의 줄기 세포를 보충, 보강 또는 촉진하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명에 따르면, 일군의 줄기 세포는 줄기 세포군에서 플러리포텐트 및 멀티포텐트한 줄기 세포의 농도를 보충, 보강 또는 촉진하기 위하여 일군의 배아-유사 줄기 세포와 혼합된다. 본 발명에 따르면, 일군의 줄기 세포는 이식을 위한 치료용도, 질병의 치료 및 예방, 및 진단 용도와 연구 용도를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 용도와 적용을 가지는 일군의 배아-유사 줄기 세포와 혼합된다.

- [0048] 본 발명은 또한 줄기 세포와 배아-유사 줄기 세포의 혼합물이 하나의 백 또는 컨테이너에 포함된 조성물을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 일군의 줄기 세포와 일군의 배아-유사 줄기 세포가 두개의 분리된 백 또는 컨테이너에 포함된 조성물을 제공한다. 일정 실시예에서, 그러한 "두개의 백" 조성물은 그것이 필요한 환자에게 투여 시에 또는 투여 전에, 바람직하게는 투여 직전에, 혼합될 수도 있다. 다른 실시예에서, 각 백의 내용물은 환자에게 분리되어 투여될 수도 있는데, 이 경우 두개의 세포군은 *in vivo*에서 부속적으로 사용된다.
- [0049] 본 발명은 또한 일군의 줄기 또는 전구 세포 또는 저장된 또는 저온보존된 코드 혈액을 포함하는 코드 혈액을 일군의 배아-유사 줄기 세포와 혼합하는 방법을 제공한다. 일실시예에서, 두 군이 물리적으로 혼합된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 두 군은 물리적으로 혼합되고, 그 후 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 줄기 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포는 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리되고, 그 후 물리적으로 혼합된다.
- [0050] 본 발명은 또한 예를 들어 신경, 근육 세포, 조혈, 혈관 세포, 지방 세포, 연골 세포(chondrocytes), 골세포(osteocytes), 간세포(hepatocytes), 췌장, 또는 심장 세포와 같은 세포로 분화하도록 지정된 일군의 세포를 일군의 배아-유사 줄기 세포와 혼합하는 방법을 제공한다. 일실시예에서, 두 군은 물리적으로 혼합된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 두 군은 물리적으로 혼합되고, 그 후 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 지정된 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포는 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리되고, 그 후 물리적으로 혼합된다.
- [0051] 본 발명의 방법에 따르면, 배아-유사 줄기 세포는 탯줄 동맥과 탯줄 정맥을 둘 다 이용하거나 또는 하나만 이용하는 관류 기술에 의하여 배수된 태반으로부터 추출된다. 태반은 바람직하게 혈액체거 및 잔류 탯줄 혈액과 같은 잔류 혈액의 수집에 의하여 배수된다. 배수된 태반은 그 후 *ex vivo*적이고, 자연적인 바이오리액터 환경을 설정하는 방식으로 처리되고, 그 안에서 실질조직(parenchyma)과 혈관 밖 영역(extravascular space)에 존재하는 배아-유사 줄기 세포가 모집된다. 배아-유사 줄기 세포는 배수된, 빈 미소순환계(microcirculation)로 이동하고, 거기에서 본 발명의 방법에 따라서 그들은 모아지는데, 바람직하게는 관류에 의하여 모집 용기로 씻겨지듯 모아진다.
- [0052] 위에서 설명된 것처럼, 많은 수의 다른 다능성 또는 중복성 줄기 세포는 CD34+/CD38+, CD34+/CD38-, 및 CD34-/CD38- 조혈 세포와 같이 관류 동안 다른 시점에서, 관류되는 태반으로부터 분리될 수 있다. 일실시예에서, 그러한 세포는 본 발명의 방법에 따라서 코드 혈액 세포와 같은 일군의 줄기 세포를 보충하기 위해 사용될 수도 있다.
- [0053] 본 발명은 또한 모든 세포 타입으로 분화될 수 있는 잠재력을 가진 분리된 균질적 인간 태반 줄기 세포군을 제공한다. 다른 실시예에서, 일군의 인간 태반 줄기 세포는 한 가지 세포 타입으로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 또 다른 실시예에서, 일군의 인간 태반 줄기 세포는 여러 가지 다른 세포 타입으로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 그러한 세포들은 본 발명의 방법에 따라서 코드 혈액과 같은 일군의 줄기 세포를 보충하기 위해 사용될 수도 있다.
- [0054] 본 발명은 또한 일군의 줄기 세포를 일군의 배아-유사 줄기 세포와 혼합하는 방법을 제공한다. 일실시예에서, 두개 균일 물리적으로 혼합된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 두 군은 물리적으로 혼합되고, 그 후 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 줄기 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포는 세포 분화를 유도하기 위하여 시토카인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리되고, 그 후 물리적으로 혼합된다. 일실시예에서, 혼합된 군들은 다양한 세포 타입으로의 분화를 유도하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 다른 실시예에서, 혼합된 군들은 특정 세포 타입으로의 분화를 유도하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 다른 실시예에서, 혼합된 군들은 특정 세포 타입으로의 분화를 방지 또는 억제하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 일정 실시예에서, 배양 상태는 조절될 수 있는데, 예를 들어 세포의 혼합군은 특정 세포 타입으로 분화를 유도하거나 연결시키기 위하여 특정 시토카인 또는 인터루킨 혼합물로 처리될 수도 있다.
- [0055] 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 배아-유사 줄기 세포군으로 보충된, 예를 들어 코드 혈액 세포와 같은, 일군의 줄기 세포를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0056] 본 발명은 또한 고농도(또는 더 수가 많은 세포군)의 균질적 조혈 줄기세포를 가지는 세포군 하나 또는 그 이상

의 세포군으로 보충된 줄기 세포군, 예를 들어 탯줄 혈액 세포군을 포함하는 약학적 조성물을 망라하는데, 여기서 균질적 조혈 줄기세포에는 CD34+/CD38-세포; 및 CD34-/CD38- 세포가 포함되지만 이에 한정되는지 않는다. 하나 이상의 이러한 세포군은 코드 혈액 조혈 세포 즉, 이식 및 다른 용도를 위한 CD34+/CD38+ 조혈 세포와 같이 사용되거나, 또는 혼합될 수 있다.

[0057] 본 발명에 따르면, 태반으로부터 유래된 배아-유사 줄기 세포로 보충된, 예를 들어 탯줄 혈액과 같은, 일군의 줄기 세포는 치료적 및 진단적 용도를 포함하는 다양한 용도를 가진다. 보충된 일군의 줄기 세포는 이식을 위해서 또는 질병의 치료 또는 예방을 위해서 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에서, 보충된 일군의 세포는 조직과 장기를 수선하고 재위치하기 위해 사용될 수 있는데, 그것에 의하여 질병에 걸린 조직, 장기 또는 그들의 부분을 재배치하거나 회복시킨다. 다른 실시예에서, 보충된 일군의 줄기 세포는 유전적 이상을 검사하기 위한 진단의 용도로 사용되거나 특정 질환 또는 이상에 대한 전처리(predisposition)로 사용될 수 있다.

[0058] 본 발명은 또한 배아-유사 줄기 세포로 보충된 일군의 줄기 세포를 투여함으로써 그것이 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은 환자에게 보충된 군을 투여하기 전에 배아-유사 줄기 세포와 줄기 세포를 혼합함으로써 발생한다. 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은, 예를 들어 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포의 동시 투여와 같이, 환자에게 보충된 군을 투여함으로써 발생한다. 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은, 예를 들어 줄기 세포 투여와 분리하여, 그 전에 또는 그 후에, 배아-유사 줄기 세포를 투여하는 것과 같이, 환자에게 코드 혈액 세포를 투여한 후에 발생한다.

[0059] **태반을 분리하고 배양하는 방법**

[0060] 태반의 전처리

[0061] 본 발명의 방법에 따르면, 인간 태반은 출생 후 그것의 압박방출 후 즉시 회수되고, 일정 실시예에서는 태반 안의 코드 혈액이 회수된다. 몇몇 실시예에서는 태반은 통상적인 코드 혈액 회수 절차에 이용된다. 그러한 코드 혈액 회수물은 상업적으로 예를 들어 LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry 및 Cryocell로부터 얻어질 수 있다. 그 코드 혈액은 태반의 압박방출 직후에 배출될 수 있다.

[0062] 다른 실시예에서, 태반은 동시-계류 중인 미국출원 출원번호 제10/076,180호(2002년 2월 13일 출원)에 따라 전처리된다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다.

[0063] 태반의 혈액 제거 및 잔류 세포의 제거

[0064] PCT특허 제02/064755호(2002년 8월 22일 발행)에 개시된 것처럼, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다, 출생 후의 태반은 태반이 출생 후에 적절히 조작된다면 활성화될 수 있는 정지상태의 세포를 포함하고 있다. 예를 들어 자궁으로부터의 압박 방출 후에, 세포자멸(apoptosis)을 최소화하거나 방지하기 위하여 가능한 빨리 태반에서 혈액이 제거된다. 그 후, 혈액제거 후 가능한 빨리, 장기 안에 존재하는 혈액, 잔류 세포, 단백질, 인자 및 여러 다른 물질들을 제거하기 위하여 태반은 관류된다. 물질 부스러기 또한 태반으로부터 제거될 수도 있다. 관류는 일반적으로 적어도 2시간 이상부터 24시간 이상 동안 적당한 관류액으로 계속된다. 태반은 그러므로 배아-유사 줄기 세포의 풍부한 공급원으로 사용될 수가 있는데, 그러한 세포는 약물 개발, 질병의 치료 및 예방, 특히 이식 수술 또는 치료, 및 지정된(committed) 세포, 조직 및 오르가노이드의 생성을 포함하는 연구를 위하여 사용될 수 있다.

[0065] 게다가, 놀랍고 그리고 뜻밖에도, 혈액 제거되고, 관류된 그리고/또는 배양된 태반에 의해 생성된 인간 태반 줄기 세포는 여러 바람직한 세포 타입으로 쉽게 분화될 수 있는 다능성 줄기 세포이다.

[0066] 본 발명의 방법에 따르면, 배아-유사 줄기 세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 줄기 또는 전구 세포는 혈액이 제거된 즉, 출생 및/또는 통상적인 코드 혈액 회수 과정 후에 남아있는 코드 혈액이 완전히 배출된 태반으로부터 회수될 수도 있다. 본 발명의 방법에 따르면, 태반 안 혈액 제거방법 및 잔류 세포 제거방법은 통상적으로 알려진 어떠한 방법, 예를 들어 PCT특허 제02/064755호, 2002년 8월 22일 발행,에 개시된 방법들과 같은 방법에 의하여 쉽게 행해질 수 있다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다.

[0067] 태반 배양

[0068] 태반에서 혈액을 제거하고 충분한 시간 동안 관류한 후에, 배아-유사 줄기 세포는 혈액 제거되고 관류된 태반의 미소순환계로 이동하는 것이 관찰되는데, 거기에서 본 발명의 방법에 따라 배아-유사 줄기 세포는 모아진다. 바람직하게는 관류에 의해 모집 용기 안으로 씻어짐에 의해 모아진다. 다른 실시예에서, PCT특허 제02/064755호, 2002년 8월 22일 발행,에 개시된 방법에 따라서 태반은 배양되고, 증식된 세포가 관찰되고, 분류되고 및/또는 특성화된다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다.

[0069] 태반으로부터 세포의 수집

[0070] 태반에서 혈액을 제거하고 충분한 시간 동안 관류한 후에, 배아-유사 줄기 세포는 배출된, 빈 태반의 미소순환계로 이동하는데, 거기에서 본 발명의 방법에 따라 배아-유사 줄기 세포는 모아진다. 바람직하게는 수집 용기 안으로 유출되는 관류액을 모음으로써 모아진다.

[0071] 바람직한 실시예에서, 태반 안에서 배양된 세포는 본 발명이 속한 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 잘 알려진 기술, 예를 들어 밀도 그레디언트 원심분리, 마그네트(magnet) 세포 분리, 흐름세포측정(flow cytometry), 또는 다른 세포 분리 또는 분류 방법을 사용하여 유출된 관류액으로부터 분리되고, 분류된다.

[0072] 특정 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포는 태반으로부터 수집되고, 일정 실시예에서는 PCT특허 제02/064755호, 2002년 8월 22일 발행,에 설명된 방법에 따라서 보존된다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다.

[0073] 배아-유사 줄기 세포

[0074] 본 발명의 방법에 따라 얻어진 배아-유사 줄기 세포는 자가-신생하고, 조직 내에서 잠복 또는 정지상태로 남아 있을 수 있는 다능성 세포 즉, 완전한 분화 다양성을 가진 세포를 포함할 수도 있다. 태반으로부터 얻어질 수도 있는 줄기 세포는 배아-유사 줄기 세포, 중복성 세포, 지정된 전구 세포, 및 피브로블라스토이드(fibroblastoid) 세포를 포함한다.

[0075] 태반으로부터 첫 번째로 모아진 혈액은 주로 CD34+ 및 CD38+인 조혈 전구 세포를 함유하고 있는 코드 혈액으로 언급된다. 산후 관류의 첫 24시간 내에, 높은 농도의 CD34+ 및 CD38- 조혈 전구세포와 높은 농도의 CD34- 및 CD38+ 조혈 전구세포가 분리될 수도 있다. 관류 24시간 후에, 높은 농도의 CD34- 및 CD38- 세포가 앞서 언급된 세포와 함께 태반으로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 분리된 관류된 태반은 CD34+ 및 CD38- 줄기 세포와 CD34- 및 CD38+ 줄기 세포가 풍부한, 많은 양의 줄기 세포 공급원을 제공한다. 24시간 또는 그 이상 관류된 분리된 태반은 CD34- 및 CD38- 줄기 세포가 풍부한, 많은 양의 줄기 세포의 공급원을 제공한다.

[0076] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 방법에 의하여 얻어진 배아-유사 줄기 세포는 생육가능하고(viable), 정지 상태이고, 다능성 줄기 세포이다. 이 줄기 세포는 만삭의(full-term) 인간 태반 내에 존재하고, 성공적 분만과 태반 압박 방출로 회수되어 10억개의 유핵 세포를 회수하는데 이용되는데, 이는 약 5천만-1억개의 중복성 세포와 다능성 줄기 세포를 생산한다.

[0077] 태반에 의해 제공되는 인간 태반 줄기 세포는 놀랍게도 배아-유사이고, 예를 들어 이러한 세포들의 식별을 위한 다음의 세포 표면 마커들(SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+ 및 ABC-p+)의 존재가 확인되었다. 바람직하게도, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포는 OCT-4+ 및 ABC-p+ 세포 표면 마커의 존재에 의하여 특징 지워진다. 따라서 본 발명은 분리되지 않았거나, 그렇지 않다면 배아 공급원으로부터 얻어진, 하지만 다음의 마커들: SSAE3-, SSAE4-, OCT-4+ 및 ABC-p+에 의하여 식별될 수 있는 줄기 세포를 포함한다. 일실시예에서, 인간 태반 줄기 세포는 MHC 클래스 2 항원을 발현하지 않는다.

[0078] 태반으로부터 분리된 줄기 세포는 균질하고, 무균이다. 게다가, 줄기 세포는 인간에게 투여하기 적당한 형태 즉, 약학적 그레이드로 쉽게 얻어진다. 본 발명의 방법에 의하여 얻어진 바람직한 배아-유사 줄기 세포는 다음의 세포 표면 마커: OCT-4+ 및 ABC-pt의 존재에 의하여 식별될 수도 있다. 더욱이, 본 발명은 다음의 마커: CD10+, CD38-, CD29+, CD34-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, 및 ABC-p+를 가진 배아 줄기 세포를 포함한다. 그러한 세포 표면 마커는 일반적으로 세척과 항-세포 표면 마커 항

체를 이용한 염색 후에 본 발명이 속한 분야에 잘 알려진 방법, 예를 들어 흐름세포측정(flow cytometry)과 같은 방법에 따라서 결정된다. 예를 들어 CD-34 또는 CD-38의 존재를 결정하기 위하여, 세포는 PBS로 세척되고, 그 후 항-CD34 피코에리쓰린(phycoerythrin)과 항-CD38 플루오레세인(fluorescein) 이소티오시아네이트(isothiocyanate) (Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 이중-염색된다.

[0079] 다른 실시예에서, 태반 바이오리액터에서 배양된 세포는 콜로니 형성 유닛 분석법에 의하여 식별되고 특성화된다. 그러한 방법은 Mesen Cult™ medium (stem cell Technologies, Inc., Vancouver British Columbia)과 같이 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려져 있다.

[0080] 본 발명의 방법에 따라 얻어진 배아-유사 줄기 세포는 지방세포형성의(adipogenic), 연골세포형성의(chondrogenic), 뼈형성의(osteogenic), 조혈(hematopoietic), 근육의(myogenic), 혈관형성의(vasogenic), 신경형성의, 및 간세포형성의 특이 세포 계통을 포함하는 특히 세포 계통으로 분화하도록 유도될 수도 있다. 일정 실시예에서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 배아-유사 줄기 세포는 이식 시 용도 및 *ex vivo* 치료 프로토콜을 위해 분화되도록 유도된다. 일정 실시예에서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 배아-유사 줄기 세포는 특정 세포 타입으로 분화되도록 유도되고, 치료적 유전자 산물을 제공하도록 유전학적으로 조작된다. 특정 실시예에서, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 배아-유사 줄기 세포는 분화를 유도하는 화합물과 함께 *in vitro* 배양되고, 그 후 일정 객체에 분화된 세포의 직접적 이식이 행하여진다. 따라서 본 발명은 표준 배양 매질을 이용하여 인간 태반 줄기 세포를 분화하는 방법을 포함한다. 게다가, 본 발명은 조혈 세포, 신경 세포, 섬유아세포, 스트랜드(strand) 세포, 중간엽 세포 및 간세포를 포함한다.

[0081] 배아-유사 줄기 세포는 또한 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법들을 사용하여 태반으로부터 수집된 후 더 배양될 수도 있다. 예를 들어 배아-유사 줄기 세포의 계속된 장기 배양을 얻기 위하여 배아-유사 줄기 세포와 동일한 태반 또는 다른 인간 또는 비인간 공급원에서 얻어진 조사된 섬유아세포와 같은 피더 세포(feeder cell) 위에서 배양하거나, 그러한 피더 세포의 배양으로부터 얻은 조작된 매질 안에서 배양하여 더 배양될 수 있다. 배아-유사 줄기 세포는 또한 태반 바이오리액터로부터 수집 전에 태반 내에서 또는 태반으로부터 회수 후 *in vitro*로 증식될 수도 있다. 일정 실시예에서, 증식될 배아-유사 줄기 세포는 세포 분화를 억제하는 성분에 노출되거나 그 성분의 존재 하에서 배양된다. 그러한 성분은 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려져 있는데, 인간 델타-1 및 인간 세레이트(Serrate)-1 폴리펩타이드(Sakano 등 미국특허 제6,337,387호, "분화-억제 폴리펩타이드", 2002년 1월 8일 발행 참조), 백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor, LIF) 및 줄기 세포 인자를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 세포군의 증식을 위한 방법은 본 발명이 속한 분야에 잘 알려져 있다 (예를 들어 Emerson 등, 미국특허 제6,326,198호, "줄기 세포의 *ex vivo* 복제를 위한, 조혈 전구 세포의 최적화를 위한, 및 대사, 인간 스트로말(stromal) 세포의 GM-CSF 분비 및/또는 IL-6 분비를 증가시키기 위한 방법 및 조성물", 2001년 12월 4일 발행; Kraus 등, 미국특허 제6,338,942호, "타겟 세포군의 선택적 증식", 2002년 1월 15일 발행 참조).

[0082] 배아-유사 줄기 세포는 그 생존가능성(viability), 증식 잠재력, 및 수명(longevity)이 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 표준 기술을 사용하여 평가될 수도 있다. 그러한 표준 기술에는 생존가능성을 평가하기 위한 트리판블루(trypsin blue) 블루 배제 어세이, 디아세트산플루오레사인 흡수 분석법(fluorescein diacetate uptake assay), 요오드화프로피디움(propidium iodide) 흡수 분석법과 증식을 평가하기 위한 티미딘 흡수 분석법, MTT 세포 증식 어세이 등이 있다. 수명은 연장된 배양에서 군 2배 증식(doubling)의 최대 수를 평가하는 것과 같은 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 의하여 측정될 수 있다.

[0083] 일정 실시예에서, 혈액 제거된, 관류된 및/또는 배양된 태반에서 배양된 줄기 세포 또는 전구 세포의 분화는 태반으로부터 모아진 세포의 분화를 억제, 조절(modulate) 및/또는 규제하기에 충분한 효과를 발휘하기 위한, 단회 또는 반복 투여로 효과적인 단회 투여량 및/또는 반복 투여량을 포함하는 약학적 조성물 또는 성분을 사용하여 조절된다.

[0084] 줄기 또는 전구 세포 분화를 유도하는 성분은 본 발명이 속한 분야에 잘 알려져 있다. 그 예로 Ca²⁺, EGF, α-FGF, β-FGF, PDGF, 케라티노사이트(keratinocyte) 성장 인자(KGF), TGF-β, 시토키인(예를 들어, IL-1α, IL-1β, IFN-γ, TNF), 레티노익 산, 트랜스페린(transferrin), 호르몬(예를 들어, 안드로젠, 에스트로젠, 인슐린, 프로락틴, 트리아이오도티로닌(triiodothyronine), 하이드로코티손, 텍사메타손), 소듐 뷰티레이트, TPA, DMSO, NMF, DMF, 매트릭스 엘리먼트(예를 들어, 콜라겐, 헤파란 설페이트, Matrigel™), 또는 그들의 혼합물이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0085] 세포 분화를 억제하는 성분 또한 본 발명이 속한 분야에 잘 알려져 있다. 그 예로 인간 텔타-1 및 인간 세레이트-1 폴리펩타이드(Sakano 등, 미국특허 제6,337,387호, "분화-억제 폴리펩타이드", 2002년 1월 8일 발행), 백혈병 억제 인자(LIF), 및 줄기 세포 인자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0086] 분화를 조절하기 위하여 사용되는 성분은 태반 내에서 배양되고 있는 세포의 분화를 유도하기 위하여 태반 바이오리액터 내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 그 성분은 세포가 태반으로부터 모이지거나 제거된 후에 *in vitro* 에서 분화를 조절하기 위해 사용될 수 있다.
- [0087] 줄기 세포가 특정 세포 타입으로 분화하였는지에 관한 판단은 본 발명이 속한 분야에 잘 알려진 방법들에 의하여 수행된다. 예를 들어 빛 또는 초점 공유 현미경을 사용하여 세포의 형태를 조사하거나 PCR 및 유전자-발현 프로파일링(profiling)과 같은 잘 알려진 기술을 사용하여 유전자 발현의 변화를 측정함으로써, 흐름 세포 측정 또는 면역 세포 화학(immunocytochemistry) (예를 들어 조직-특이 또는 세포-마커 특이 항체로 세포를 염색)과 같은 기술을 사용하여 형태와 세포 표면 마커의 변화를 측정함으로써 수행될 수 있다.
- [0088] **배아-유사 줄기 세포로 일군의 줄기 세포 보충**
- [0089] 본 발명은 배아-유사 줄기 세포와 혼합된 일군의 줄기 세포에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 배아-유사 줄기 세포와 혼합될 수 있는 줄기 세포는 태줄 혈액, 태아 및 신생아 조혈 줄기 세포 및 전구 세포, 골수에서 유래한 인간 줄기 세포 및 전구세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포는 태줄 혈액과 혼합된다.
- [0090] 본 발명은 모든 세포 타입으로 분화될 수 있는 잠재력이 있는, 분리된 균질한 인간 태반 줄기 세포군(배아-유사 줄기 세포)을 제공한다. 그러한 세포는 본 발명의 방법에 따라서 예를 들어 코드 혈액 세포와 같은 일군의 줄기 세포를 보충하기 위해 사용될 수 있다.
- [0091] 본 발명은 또한 태반에서 유래한 일군의 배아-유사 줄기 세포로 보충된 (즉, 혼합된, 결합된 또는 보강된) 일군의 코드 혈액 세포를 제공한다.
- [0092] 보충된 군들은 생존가능성이 매우 크며, 그 안에, 예를 들어 CD34+/CD38+, CD34+/CD38- 또는 CD34-/CD38-표현형을 보이는 세포와 같은, 다능성 또는 중복성 줄기 세포인 일군의 세포를 포함한다.
- [0093] 본 발명에 따르면, 본 발명의 보충된 일군의 줄기 세포는 각 군 안의 총 유효세포의 수를 기준으로 비교할 때 100,000,000:1, 50,000,000:1, 20,000,000:1, 10,000,000:1, 5,000,000:1, 2,000,000:1, 1,000,000:1, 500,000:1, 200,000:1, 100,000:1, 50,000:1, 20,000:1, 10,000:1, 5,000:1, 2,000:1, 1,000:1, 500:1, 200:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:100; 1:200; 1:500; 1:1,000; 1:2,000; 1:5,000; 1:10,000; 1:20,000; 1:50,000; 1:100,000; 1:500,000; 1:1,000,000; 1:2,000,000; 1:5,000,000; 1:10,000,000; 1:20,000,000; 1:50,000,000; 또는 1:100,000,000의 비율로 배아-유사 줄기 세포와 다른 줄기 또는 전구 세포를 포함한다. 일 실시예에서, 그것이 필요한 환자에게 전해기 전에 일정 수(또는 군)의 배아-유사 태반 줄기 세포는 일정 수의 태줄 혈액에 더해진다.
- [0094] 본 발명은 또한 일군의 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 두 군이 물리적으로 혼합된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 두개의 군은 물리적으로 혼합되고 그 후 세포분화를 유도하기 위하여 시토키인 및/또는 모든 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리된다. 이 실시예의 다른 측면에서, 코드 혈액 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포는 세포 분화를 유도하기 위하여 시토키인 및/또는 인터루킨과 같은 성장 인자로 처리되고, 그 후 물리적으로 혼합된다.
- [0095] 본 발명은 또한 배아-유사 줄기 세포로 보충된 일군의 코드 혈액 세포를 투여함으로써 그것이 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은 환자에게 보충된 군을 투여하기 전에 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포를 혼합함으로써 발생한다. 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은, 예를 들어 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포를 동시에 투여하는 것과 같이, 환자에게 보충된 군의 투여 시에 발생한다. 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포로 일군의 코드 혈액 세포를 보충하는 것은, 예를 들어 코드 혈액 세포의 투여로부터 분리된, 투여 전에 또는 투여 후에, 배아-유사 줄기 세포의 투여와 같이, 코드 혈액의 투여 후에 발생한다.
- [0096] 일 실시예에서, 본 발명은 하나의 백 안에 혼합물이 포함된 것을 특징으로 하는 배아-유사 줄기 세포로 코드 혈액 세포를 보충하는 방법을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포가 각

각 다른 백 안에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 배아-유사 줄기 세포로 코드 혈액 세포를 보충하는 방법을 제공한다. 그러한 "두개의 백" 조성물은 그것이 필요한 환자에게 투여 시에 또는 투여 전에 혼합될 수 있다.

- [0097] 다른 실시예에서, 일정 수(또는 군)의 배아-유사 태반 줄기 세포는 그것이 필요한 환자에게 전달되기 전 일정 수의 탯줄 혈액에 첨가되기 전에, 그리고 혼합되기 전에 조정된다. 예를 들어, 이러한 실시예의 일 측면에서, 일군의 배아-유사 태반 줄기 세포는 일정 수의 탯줄 혈액에 첨가되어 혼합되기 전에, 전술한 바와 같이 시토카인(예를 들어, IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , TNF), 레티노익 산, 트랜스페린(transferrin), 호르몬(예를 들어, 안드로젠, 에스트로젠, 인슐린, 프로락틴, 트리아이오도티로닌(triiodothyronine), 하이드로코티손, 텍사메타손), 소듐 뷰티레이트, TPA, DMSO, NMF, DMF, 매트릭스 엘리먼트(예를 들어, 콜라겐, 헤파란 설페이트, Matrigel™), 또는 그들의 혼합물에 노출함으로써, 지방세포형성의(adipogenic), 연골세포형성의(chondrogenic), 뼈형성의(osteogenic), 조혈(hematopoietic), 근육의(myogenic), 혈관형성의(vasogenic), 신경형성의, 및 간세포형성의 특이 세포 계통과 같은 특히 세포 계통으로 분화하도록 유도될 수도 있다.
- [0098] 이러한 실시예의 다른 측면에서, 일군의 배아-유사 태반 줄기 세포는 일정 수의 탯줄 혈액에 첨가되기 전에, 그리고 혼합되기 전에, 예를 들어 인간 델타-1 및 인간 세레이트-1 폴리펩타이드, 또는 그들의 혼합물과 같은 분화를 억제하는 성분에 노출됨으로써 조정될 수 있다.
- [0099] 다른 실시예에서, 일정 수(또는 군)의 비-조정 배아-유사 태반 줄기 세포와 일정 수의 탯줄 혈액은 혼합되고, 혼합된 세포군은 그것이 필요한 환자에게 전달되기 전에 조정된다. 특정 실시예에서, 혼합된 배아-유사 태반 줄기 세포와 탯줄 혈액 세포의 군은 전술한 바와 같이 세포 분화를 유도 또는 억제하기 위한 성분으로 조정된다.
- [0100] 특정 실시예에서, 본 발명의 일군의 배아-유사 줄기 세포는 그것이 필요한 환자에게 투여되기 전에 일군의 탯줄 혈액 세포에 첨가되거나 또는 혼합된다. 다른 특정 실시예에서, 본 발명의 일군의 배아-유사 줄기 세포는 그것이 필요한 환자에게 투여하는 동안 또는 투여와 동시에 일군의 탯줄 혈액 세포에 첨가되거나 또는 혼합된다. 다른 특정 실시예에서, 본 발명의 일군의 배아-유사 줄기 세포와 일군의 탯줄 혈액 세포는 그것이 필요한 환자에게 연속적으로 투여된다. 일실시예에서, 일군의 배아-유사 줄기 세포가 먼저 투여되고, 일군의 탯줄 혈액 세포가 두 번째로 투여된다. 다른 실시예에서, 일군의 탯줄 혈액 세포가 먼저 투여되고, 일군의 배아-유사 태반 줄기 세포가 두 번째로 투여된다.
- [0101] 배아-유사 줄기 세포로 스파이크된 일군의 코드 혈액 세포는 영양소, 호르몬, 비타민, 성장 인자, 또는 이들의 혼합물을 배양 매질에 도입하는 것에 의해 스파이크된 군을 처리하는 것을 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 다양한 조건 하에서 배양되고, 증식하도록 유도되고, 및/또는 분화하도록 유도될 수 있다. 혈청과 다른 성장 인자들이 배양 매질에 첨가될 수 있다. 성장 인자는 일반적으로 단백질이고, 시토카인, 림포카인, 인터페론, 콜로니 자극 인자(CSF), 인터페론, 케모카인, 및 인터루킨을 포함하지만, 하지만 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 다른 성장 인자는 리간드를 포함하는 재조합 인간 조혈 성장 인자, 줄기 세포 인자, 쓰롬보포에이틴(Tpo), 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 백혈병 억제 인자, 기초 섬유아세포 성장 인자, 태반 유래 성장 인자 및 상피 성장 인자(epidermal growth factor)를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 일실시예에서, 보충된 군은 여러 가지 세포 타입으로 분화 유도하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 다른 실시예에서, 스파이크된 군은 특정 세포 타입으로 분화 유도하기 위하여 성장 인자로 처리된다. 다른 실시예에서, 보충된 군은 특정 세포 타입으로의 분화가 억제 또는 방지되도록 성장 인자로 처리된다.
- [0102] 본 발명의 일정 실시예에서, 일군의 코드 혈액을 보충하는 방법은 (a) 배아-유사 줄기 세포의 분화 유도, (b) 일군의 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포의 혼합, 및 (c) 그것이 필요한 환자에게 혼합물의 투여를 포함한다.
- [0103] 본 발명의 다른 실시예에서, 일군의 코드 혈액을 보충하는 방법은 (a) 일군의 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포의 혼합; (b) 스파이크된 일군의 코드 혈액 세포와 배아-유사 줄기 세포 혼합물의 분화 유도 및 (c) 그것이 필요한 환자에게 혼합물의 투여를 포함한다.
- [0104] 본 발명의 다른 실시예에서, 일군의 코드 혈액을 보충하는 방법은 (a) 그것이 필요한 환자에게 배아-유사 줄기 세포로 보충된 코드 혈액 세포의 혼합물의 투여 및 (b) 혼합물의 분화 유도 및 (c) 그것이 필요한 환자에게 혼합물의 투여를 포함한다.
- [0105] 일정 실시예에서, 줄기 또는 전구 세포는 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라서 성장 인자에 노출됨으로써 특정 세포 타입으로 분화되도록 유도된다. 특정 실시예에서, 성장 인자는 :GM-CSF, IL-4, Flt3L, CD40L, IFN-alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-2, IL-6, 레티노익 산, 기초 섬유아세포 성장 인자, TGF-beta-1,

TGF-beta-3, 간세포 성장 인자, 상피 성장 인자, 카르디오토크린(cardiotropin)-1, 안지오텐시노젠, 안지오텐신 I(AI), 안지오텐신 II(AII), AII AT₂ type 2 수용체 작용제, 또는 그 유사체 또는 그 단편이다.

- [0106] 일실시에에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 β-머캅토에탄올 또는 DMSO/뷰티레이티드 하이드록시아니솔에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 신경으로 분화하도록 유도된다.
- [0107] 다른 실시예에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 텍사메타손, 인도메타신, 인슐린 및 IBMX에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 지방세포(adipocyte)로 분화하도록 유도된다.
- [0108] 다른 실시예에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 TGF-베타-3에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 연골세포로 분화하도록 유도된다.
- [0109] 다른 실시예에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 텍사메타손, 아스코르빅 산-2-포스페이트 및 베타-글리세로포스페이트에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 골세포로 분화하도록 유도된다.
- [0110] 다른 실시예에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 IL-6 +/-IL-15에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 간세포로 분화하도록 유도된다.
- [0111] 다른 실시예에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 기초 섬유아세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor) 및 변환 성장 인자 베타-1(transforming growth factor beta-1, TGF-beta-1)에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 췌장세포로 분화하도록 유도된다.
- [0112] 다른 실시예에서, 줄기 또는 전구세포는, 예를 들어 후술하는 방법에 따라 기초 섬유아세포 성장 인자, TGF-베타-1 및 상피 성장 인자에 노출시키는 것, 카르디오토크린(cardiotropin)-1에 노출시키는 것, 인간 심근 추출물에 노출시키는 것과 같은, 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 방법에 따라 심장세포로 분화하도록 유도된다.
- [0113] 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포는 면역글로블린, 호르몬, 효소와 같은 생반응성(bioactive) 분자를 생성하도록 자극된다.
- [0114] 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포는, 예를 들어 에리트로포이에틴(erythropoietin), 시토카인, 림포카인, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터페론, 케모카인, 리간드를 포함하는 인터루킨, 재조합 인간 조혈 성장 인자, 줄기 세포 인자, 쓰롬보포에틴(Tpo), 인터루킨, 및 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF) 또는 다른 성장 인자의 투여에 의하여 증식하도록 자극된다.
- [0115] 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포는, 예를 들어 아데노바이러스 또는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스성 벡터를 사용함으로써 또는 리포소말 또는 화학적 매개 DNA 업테이크와 같은 기계적 수단을 사용함으로써, 태반으로부터 수집되기 전에, 또는 수집 후에 유전적으로 조작된다.
- [0116] 형질전환유전자(transgene)을 포함하는 벡터는, 예를 들어 트랜스펙션, 트랜스포메이션, 트랜스덕션(transduction), 일렉트로포레이션, 인젝션, 미세주사, 세포 융합, DEAE 텍스트란, 칼슘 포스페이트 침전, 리포솜, LIPOFECTINTM, 리소솜 융합, 합성 양이온 리피드, 유전자 총(gun)의 사용 또는 DNA 벡터 트랜스포터와 같은, 본 발명이 속하는 분야에서 잘 알려진 방법에 의하여 흥미 있는 세포 안으로 도입될 수 있다. 그렇게 형질전환유전자는, 예를 들어 배아-유사 줄기 세포의 분화에 의하여 형성된 딸 배아-유사 줄기 세포 또는 전구 세포와 같은, 딸세포로 전달된다. 포유류 세포의 트랜스포메이션 또는 트랜스펙션을 위한 다양한 기술들에 대하여는 Keown 등, 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. 에 잘 나와 있다.
- [0117] 바람직하게, 형질전환유전자는 세포의 핵막 또는 다른 존재하는 세포적 또는 유전적 구조를 파괴하지 않는 한 어떠한 기술을 사용하여서도 도입될 수 있다. 일정 실시예에서, 형질전환유전자는 미세주사에 의하여 핵 유전 물질 안으로 삽입된다. 세포의 미세주사와 세포적 구조는 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려져 있고, 일반적으로 수행된다.
- [0118] 배아-유사 줄기 세포와 같은 배양된 포유류 세포의 안정적인 트랜스펙션을 위하여서는, 세포들 중 단지 적은 수만이 자신의 게놈 안으로 외래 DNA를 받아들여 통합(integration)시키면 된다. 통합의 효율은 벡터 및 사용된 트랜스펙션 기술에 달려있다. 통합체(integrant)를 식별하고 선택하기 위하여, 선택적 마커(예를 들어 항생제

저항성)를 코딩하는 유전자가 관심 있는 유전자 서열과 함께 숙주 배아-유사 줄기 세포로 도입된다. 바람직한 선택적 마커는 G418, 하이그로마이신, 및 메소트렉세이트와 같은 약물에 저항성을 부여하는 것들을 포함한다. 도입되는 핵산으로 안정하게 트랜스펙션된 세포는 약물 선택에 의하여 식별될 수 있다 (예를 들어 선택적 마커 유전자가 포함된 세포들은 생존하는 반면 다른 세포들은 죽는다). 그러한 방법들은 환자 또는 객체에 재조합 세포의 도입 또는 트랜스플랜테이션(transplantation) 전에 포유류 세포 (예를 들어 배아-유사 줄기 세포) 내로 상동 재조합을 포함하는 방법에 있어 특히 유용하다.

[0119] 많은 선택 시스템이 변형된 숙주 배아-유사 세포를 선택하기 위하여 사용될 수도 있다. 특히 벡터는 검출 가능한 또는 선택 가능한 마커를 포함할 수도 있다. 선택의 다른 방법은 각각 tk-, hgprrt- 또는 aprt-세포에 적용되는, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler 등, 1977, Cell 11: 223), 하이퍼산틴-구아닌 포스포리보실트랜스페라제 (Szybalska 및 Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026), 및 아데닌 포스포리보실트랜스페라제 (Lowy 등, 1980, Cell 22: 817) 유전자를 포함하는 다른 마커에 대한 선택을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 항대사체(antimetabolite) 저항성이 다음의 유전자에 대한 선택의 기초로 사용될 수 있다: 메소트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 dhfr (Wigler 등, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare 등, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); 미코페놀릭 산에 대한 저항성을 부여하는 gpt (Mulligan 및 Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); 아미노글리코사이드 G418에 대한 저항성을 부여하는 neo (Colberre-Garapin 등, 1981, J. Mol. Biol. 150: 1); 및 하이그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 hygro (Santerre 등, 1984, Gene 30: 147).

[0120] 형질전환유전자는 원하는 세포의 게놈으로 통합될 수 있는데, 무작위적 통합이 바람직하다. 다른 실시예에서, 형질전환유전자는, 예를 들어 직접적 상동 재조합(directed homologous recombination) (즉, 관심 있는 세포 내로 관심 있는 유전자의 "닉-인" 또는 "닉-아웃"), Chappel, 미국특허 제5,272,071호; 및 PCT특허 제91/06667호, 1991년 5월 16일 발행; 미국특허 제5,464,764호, Capecchi 등, 1995년 11월 7일 발행; 미국특허 제 5,627,059호, Capecchi 등, 1997년 5월 6일 발행; 미국특허 제5,487,992호, Capecchi 등, 1996년 1월 30일 발행)와 같은, 직접적인 방법들에 의해 통합될 수 있다.

[0121] 상동 재조합을 통하여 목표하는 유전자 조작을 거친 세포를 생산하는 방법들은 본 발명이 속한 분야에 잘 알려져 있다. 그 구조물(construct)은 바람직한 유전자 조작을 거친 흥미 있는 유전자의 적어도 일정 부분을 포함할 것이고, 목표 유전자자리와 상동 부분 즉, 숙주 게놈 안의 목표 유전자의 내부 카피를 포함할 것이다. 상동 재조합을 위하여 사용된 것들과는 대조적으로, 부분 통합을 위한 DNA 구조물은 재조합을 조정하기 위하여 상동 영역을 포함할 필요가 없다. 마커는 형질전환유전자의 삽입에 대한 양성 및 음성 선택들 수행하기 위하여 목표하는 구조물 또는 랜덤(random) 구조물 안으로 포함될 수 있다.

[0122] 예를 들어 상동 재조합 배아-유사 줄기 세포, 내부 태반 세포 또는 태반에서 배양된 외인성 세포와 같은 상동 재조합 세포를 만들기 위하여, 상동 재조합 벡터는 벡터에 의하여 운반되는 관심 있는 유전자와 목표 세포의 게놈의 내부 유전자 사이에 발생하는 상동 재조합을 위하여 목표 세포의 게놈에 내부적으로 존재하는 유전자 서열로 5- 및 3- 말단에서 관심 있는 유전자가 프랭크된(flanked) 상태로 제조된다. 추가적인 프랭킹(flanking) 핵산 서열은 목표 세포의 게놈에서 내부 유전자와 성공적인 상동적 재조합을 위하여 충분한 길이이다. 일반적으로 수십 킬로베이스(kb)의 프랭킹 DNA (5- 및 3- 양 말단)가 벡터 안에 포함된다. 상동 재조합 벡터 및 재조합 줄기 세포로부터 상동 재조합 동물을 만드는 방법은 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려져 있다 (예를 들어 Thomas 및 Capecchi, 1987, Cell 51: 503; Bradley, 1991, Curr. Opin. Bio/Technol. 2: 823-29; 및 PCT특허 제 90/11354호, 제91/01140호, 및 제93/04169호 참조).

[0123] 일실시예에서, 본 발명의 방법에 따라 태반에서 배양된 외래 세포의 게놈은 상동 재조합 또는 랜덤 통합을 통한 유전자 타겟팅의 목표이다.

[0124] 특정 실시예에서, Bonadio 등(미국특허 제5,942,496호, 골수 세포로 다양한 유전자를 전달하기 위한 방법 및 조성물, 1999년 8월 24일 발행; 및 PCT특허 제95/22611호, 골수 세포를 자극하기 위한 방법 및 조성물, 1995년 8월 24일 발행)의 방법이, 예를 들어 줄기 세포, 전구 세포 또는 골수 전구 세포와 같은 태반에서 배양된 외래 세포와 같은, 흥미 있는 세포로 핵산을 도입하기 위하여 사용되었다.

[0125] **배아-유사 줄기 세포와 보충된 일군의 줄기 세포의 용도**

[0126] 배아-유사 줄기 세포는 동시 계류 중인 미국특허 출원번호 제01/076,180호, 2002년 2월 13일 발행,에서 설명된

방법에 따라서 관류된 태반으로부터 얻어질 수 있다.

- [0127] 태반 줄기 세포 (배아-유사 줄기 세포)는 특정 세포 타입으로, *ex vivo* 또는 *in vivo*로, 분화되도록 유도될 수 있다. 예를 들어, 플러리포텐트 배아-유사 줄기 세포는 *in vivo*로 장기 신생 및 손상 회복을 위하여 손상받은 장기로 주사될 수 있다. 그러한 손상은 주로 심근 경색, 발작 이상, 다발성 경화증, 졸도, 저혈압, 심정지, 허혈, 염증, 나이와 관련된 인식력의 손상, 방사선 손상, 뇌성 마비, 신경퇴행성 질환, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, Leigh 병, 에이즈 치매, 기억력 손상, 근육 위축성 측삭 경화증, 허혈 신 질환, 뇌 또는 척수 코드 트라우마, 심장-폐 바이패스, 녹내장, 망막 허혈, 또는 망막 트라우마를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 병태 및 이상 때문일 수 있다.
- [0128] 태반으로부터 분리된 배아-유사 줄기 세포는 단독으로 또는 줄기 또는 전구 세포군(즉 본 발명의 세포 조성물)과 함께, 특정 실시예에서, 테이-삭스(Tay-Sachs), 니만-픽(Niemann-Pick), 파브리(Fabry's), 가우셔(Gaucher's), 헌터(Hunter's), 및 허러(Hurler's) 증후군과 기타 갱글리오시드증(gangliosidosis), 점액다당류증(mucopolysaccharidosis), 및 글리코겐증(glycogenosis)와 같은 리소좀 축적병을 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 특정 질환 또는 병태를 치료하기 위한 자가 조직의 또는 이종 유래의 효소 대체 치료에서 사용될 수 있다.
- [0129] 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포는 단독으로 또는 줄기 또는 전구 세포군과 함께 유전적 대사 장애, 아드레노류코다이스트로피(adrenoleukodystrophy), 낭종섬유증, 글리코겐 축적 질환, 하이퍼티로이디즘(hypothyroidism), 겸상적혈구빈혈증(sickle cell anemia), 페아르손(Pearson) 신드롬, 폼페 병, 페닐케톤뇨증(phenylketonuria), 포르피리아(porphyrrias), 단풍시럽뇨증, 호모시스틴뇨증(homocystinuria), 점액다당류증(mucopolysaccharidosis), 만성 육아종 질환 및 티로신혈증 및 테이-삭스(Tay-Sachs) 질환을 치료하기 위하여 또는 암, 종양 또는 다른 병적 상태를 치료하기 위하여 자가 조직의 또는 이종 유래의 형질전환유전자 캐리어로서 사용될 수 있다.
- [0130] 다른 실시예에서, 세포 조성물은 각막 상피 손상, 연골 조직 치료, 안면 박피술, 점막, 고막, 장 리닝(lining), 신경학적 구조(예를 들어 망막, 기저막의 청각 신경, 후각 상피의 후각신경)의 치료, 피부의 트라우마틱(traumatic) 손상에 대한 범(bum) 및 상처의 회복, 또는 손상 받은 또는 질병이 있는 장기 또는 조직의 재구성을 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 자가 조직의 또는 이종 유래의 조직 재생성 또는 재배치 치료 또는 프로토콜에서 사용될 수 있다.
- [0131] 일정 실시예에서, 본 발명에 따른 방법을 사용하여 얻어진 많은 수의 배아-유사 줄기 세포 및/또는 전구 세포는 많은 골수 기증에 대한 필요성을 줄인다. 골수 이식을 위해서는 환자의 체중kg 당 약 1×10^8 내지 2×10^8 의 골수 단핵 세포가 주입되어야 한다 (즉 70kg 공여자에 대하여 약 70ml의 골수). 70ml를 얻기 위해서는 기증 과정에서 과도한 기증 및 혈액의 심각한 손실을 필요로 한다. 특정 실시예에서, 소량의 골수 기증(약 7-10ml)으로부터 기인한 세포가 수여자로 주입되기 전에 태반 바이오리액터 내에서 증폭될 수 있다.
- [0132] 게다가, 소량의 줄기 세포 및 전구 세포는 일반적으로 혈류 안에서 순환한다. 다른 실시예에서, 그러한 외래의 줄기 세포 또는 외래의 전구 세포는 혈액이 뽑아지고, 하나 이상의 성분이 선택적으로 제거되고, 혈액의 나머지 부분인 공여자로 주입되는 성분채집술(apheresis)에 의해서 모아진다. 성분채집술에 의하여 회수된 외래의 세포는 태반 바이오리액터 내에서 증식되고, 따라서 골수 기증에 대한 필요성을 완전히 제거한다.
- [0133] 혈액 세포들이 화학요법 치료 사이에 재생하는 동안, 암은 자연적 선택에 의하여 화학요법 약물에 저항성이 되고 성장할 시간을 가진다. 그러므로 화학요법 적용이 길어질수록, 그리고 치료 사이의 기간이 짧아질수록 암을 성공적으로 죽일 확률은 커진다. 화학요법 치료사이의 시간을 줄이기 위하여, 본 발명에 따라 수집된 배아-유사 줄기 세포 또는 전구 세포는 단독으로 또는 다른 줄기 세포 또는 전구 세포군과 함께 환자에게 도입될 수 있다. 그러한 치료는 환자가 낮은 혈액 세포 수치를 보이는 시간을 줄이고, 그러므로 화학요법 치료의 빠른 속행을 도와줄 것이다.
- [0134] 본 발명에 따라 태반에서 얻어진 배아-유사 줄기 세포, 전구 세포, 외래 세포, 또는 조작된 세포는 단독으로 또는 다른 줄기 세포 또는 전구 세포군과 함께 조직 또는 장기의 *in vivo* 제조를 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 매트릭스를 접종하고, 세포가 분화 및 매트릭스에서 거주하도록 하는 적절한 조건 하에서 배양되도록 예를 들어 배아-유사 줄기 세포, 전구 세포, 또는 외래 세포 또는 전구 세포와 같은 태반으로부터 얻어진 세포를 사용하는 것을 포함한다. 본 발명의 방법에 따라 얻어진 조직과 장기는 연구 및 치료 목적을 포함하는 다양한 목적을 위하여 사용될 수도 있다.

- [0135] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 일군의 줄기 세포는 줄기 세포 또는 전구 세포군과 같은 바람직한 세포군의 이식, 트랜스플랜테이션 또는 주입에 의해서 신체의 조직 또는 장기가 보강, 수리 또는 회복되는 다양한 예방적 또는 치료적 프로토콜에서 사용될 수 있다. 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 일군의 줄기 세포는 존재하는 조직을 보강 또는 보충하기 위하여, 새로운 또는 변경된 조직을 도입하기 위하여, 또는 생물학적 조직 또는 구조물을 연결하기 위하여 사용될 수 있다. 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 일군의 줄기 세포는 또한 배아 줄기 세포의 사용을 전형적으로 포함하는 치료 프로토콜에서 배아 줄기 세포 대신에 사용될 수 있다.
- [0136] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은, HLA 타입이 맞는 또 맞지 않는 조혈 이식을 포함하여, 자가 조직의 및 동종 이형의(allogenic) 용도로 사용될 수 있다. 동종 이형의 조혈 이식으로써 배아-유사 줄기 세포의 사용에 따라, 공여 세포의 면역거부 반응을 줄이기 위하여 숙주를 처리하는 것이 필요할 수도 있다. 이러한 것은 미국특허 제5,800,539, 1998년 9월 1일 발행; 및 미국특허 제5,806,529호, 1998년 9월 15일 발행에 잘 나타나 있다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다.
- [0137] 예를 들어, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 예를 들어 간, 췌장, 신장, 폐, 신경계, 근육계, 뼈, 골수, 가슴샘, 비장, 근육조직, 생식선, 또는 머리카락의 줄기 또는 전구 세포를 보충 또는 보강하기 위한 치료적 이식 프로토콜에서 사용될 수 있다.
- [0138] 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 전구 세포가 일반적으로 사용되는 치료적 또는 연구적 프로토콜에서 특정 클래스의 전구 세포(예를 들어 연골세포, 간세포, 조혈 세포, 췌장 실질 세포, 신경모세포, 근육 전구 세포 등) 대신에 사용될 수 있다.
- [0139] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 연골(cartilage), 힘줄(tendon), 또는 인대(ligament)의 보강, 회복 또는 보충의 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어 일정 실시예에서, 보철(prostheses) (예를 들어 엉덩이 보철)은 본 발명의 배아-유사 줄기 세포로부터 자라난 대체 연골 조직 구조물로 가지고 코팅된다. 다른 실시예에서, 관절(예를 들어 무릎)은 배아-유사 줄기 세포로부터 자라난 연골 조직 구조물로 재구성된다. 연골 조직 구조물은 또한 여러 가지 다른 타입의 관절을 위한 재건 외과수술에 적용될 수 있다. (이에 대한 프로토콜은 Resnick, D. 및 Niwayama, G. 등, 1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2d ed., W.B. Saunders Co. 참조).
- [0140] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 트라우마, 대사 이상, 또는 질병으로부터 발생한 조직 및 장기의 손상을 회복시키기 위해 사용될 수 있다. 그러한 일 실시예에서, 환자는, 예를 들어 화학요법 또는 방사선조사 후 면역계의 촉진, 심근 경색 후 심장 조직의 회복과 같이, 질병의 결과로 손상된 조직이나 장기를 재생성 또는 회복하기 위하여 배아-유사 줄기 세포를 단독으로 또는 다른 줄기 또는 전구 세포군과 함께 투여받을 수 있다.
- [0141] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 골수 이식에서 골수 세포를 보강 또는 대체하기 위하여 사용될 수 있다. 인간 자가 조직의 및 동종 이형의 골수 이식은 일반적으로 백혈병, 림프종 및 다른 생명-위협적 장애와 같은 질병의 치료수단으로 사용된다. 그러나 이러한 수단의 단점은 이식을 위한 충분한 세포가 있는지 여부를 보증하기 위하여 많은 양의 공여자 골수가 제거 되어야 한다는 점이다.
- [0142] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 많은 골수 기증에 대한 필요성을 줄일 수 있는 줄기 세포와 전구 세포를 제공한다. 본 발명의 방법에 따르면, 소량의 골수 기증을 얻고, 수여자에게 주입 또는 이식 전에 태반 내에서 배양 및 증식함으로써 줄기 세포와 전구 세포의 수를 늘린다.
- [0143] 특정 실시예에서, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 데이-사키스(Tay-Sachs), 니만-픽(Niemann-Pick), 파브리(Fabry's), 가우셔(Gaucher's), 헌터(Hunter's), 및 허러러(Hurler's) 신드롬과 다른 강리오시도제(gangliosidoses), 뮤코폴리사카리아드(mucopolysaccharidoses), 및 글리코게노제(glycogenoses)와 같은 리소솜축적병을 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 특정 질환 또는 병태를 치료하기 위한 자가 조직의 또는 이종 유래의 효소 대체 치료에서 사용될 수 있다.
- [0144] 다른 실시예에서, 그 세포들은 아드레노류코다이스트로피(adrenoleukodystrophy), 낭종섬유증, 글리코젠 축적 질환, 하이퍼티로이디즘(hypothyroidism), 겸상적혈구병(sickle cell anemia), 페아르손(Pearson) 신드롬, 폼페 병, 페닐케토뉴리아(PKU), 포르피리아(porphyrrias), 단풍시럽노병, 호노시스티뉴리아(homocystinuria), 뮤코폴리사카리아드(mucopolysaccharide) 노시스, 만성 육아종 질환 및 티로신혈증 및 데이-사키스(Tay-Sachs) 질환

과 같은 유전적 대사 장애를 치료하기 위하여 또는 암, 종양 또는 다른 병적 상태를 치료하기 위하여 자가 조직의 또는 이중 유래의 형질전환유전자 캐리어로서 사용될 수 있다.

[0145] 다른 실시예에서, 그 세포들은 각막 상피 손상, 연골 조직 치료, 안면 박피술, 점막, 고막, 장 리닝(lining), 신경학적 구조(예를 들어 망막, 기저막의 청각 신경, 후각 상피의 후각신경)의 치료, 피부의 트라우마틱(traumatic) 손상에 대한 화상 및 상처의 회복, 머리가죽(머리카락) 이식 또는 손상 받은 또는 질병이 있는 장기 또는 조직의 재구성을 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 자가 조직의 또는 이중 유래의 조직 재생성 또는 재배치 치료 또는 프로토콜에서 사용될 수 있다.

[0146] 일정 실시예에서, 본 발명에 따른 방법을 사용하여 얻어진 많은 수의 배아-유사 줄기 세포 및/또는 전구 세포는 많은 골수 기증에 대한 필요성을 줄인다. 골수 이식을 위해서는 환자의 체중kg 당 약 1×10^8 내지 2×10^8 의 골수 단핵 세포가 주입되어야 한다 (즉 70kg 공여자에 대하여 약 70ml의 골수). 70ml를 얻기 위해서는 기증 과정에서 과도한 기증 및 혈액의 심각한 손실을 필요로 한다. 특정 실시예에서, 소량의 골수 기증(약 7-10ml)으로부터 기인한 세포가 수여자로 주입되기 전에 태반 바이오리액터 내에서 증폭될 수 있다.

[0147] 다른 실시예에서, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 화학요법에 더하여 보충적 치료용으로 사용될 수 있다. 암세포를 목표로 하고 파괴하기 위해 사용되는 대부분의 화학요법제는 모든 증식 세포 즉, 세포 분할을 하는 모든 세포를 죽임으로써 작용한다. 골수는 신체에서 가장 활발히 증식하는 조직 중의 하나이기 때문에, 조혈 줄기 세포는 화학요법제에 의하여 자주 손상 받거나 파괴되고, 결과적으로 혈액 세포 생산이 감소되거나 중단된다. 화학요법치료를 재시작하기 전에 환자의 조혈 시스템이 혈액 세포 공급을 충분히 하도록 하기 위하여 일정 간격으로 화학요법치료가 중단되어야 한다. 그 전에는 정지 상태에 있는 줄기 세포가 화학요법치료를 다시 재개할 정도의 허용 가능한 수준으로 백혈구 수를 증식하고 늘리도록 하는 데는 한달 또는 그 이상의 시간이 필요하다 (다시 재개될 때, 골수 줄기 세포는 파괴된다).

[0148] 혈액 세포들이 화학요법 치료 사이에 재생하는 동안, 암은 자연적 선택에 의하여 화학요법 약물에 저항성이 되고 성장할 시간을 가진다. 그러므로 화학요법 적용이 길어질수록, 그리고 치료 사이의 기간이 짧아질수록 암을 성공적으로 죽일 확률은 커진다. 화학요법 치료사이의 시간을 줄이기 위하여, 본 발명에 따라 수집된 배아-유사 줄기 세포 또는 전구 세포는 환자에게 도입될 수 있다. 그러한 치료는 환자가 낮은 혈액 세포 수치를 보이는 기간을 줄이고, 그러므로 화학요법치료의 빠른 속행을 도와줄 것이다.

[0149] 다른 실시예에서, 인간 태반 줄기 세포는 만성 육아종 질환과 같은 유전적 질환을 치료 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다.

[0150] **약학적 조성물**

[0151] 본 발명은 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다. 본 발명은, 예를 들어 중배엽, 지방, 연골세포의, 골세포의, 근육세포의, 혈관의, 신경의, 상피의, 간의, 신장, 췌장, 및/또는 조혈 계통 세포와 같은, 하나 이상의 세포 계통으로의 태반 유래 인간 플러리포텐트 및 멀티포텐트한 전구 줄기 세포의 분화를 억제, 조절 및/또는 조정하기에 충분한 효과를 발휘할 수 있는 조작된 또는 조작되지 않은 인간 전구 줄기 세포의 이식 전에 또는 후에 단회 또는 반복 투여에 효과적인 투여량 및/또는 반복투여량을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

[0152] 이러한 실시예에 따르면, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 줄기 세포군은 주사제로 제제화될 수 있다 (예를 들어 PCT특허 제96/39101호 참조, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다). 대안적인 실시예에서, 본 발명의 세포들과 조직들은 미국특허 제5,709,854호; 제5,516,532호; 제5,654,381호에서 설명된 것과 같이 폴리머화된 또는 크로스 링킹 하이드로겔을 사용하여 제제화될 수 있다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다. 배아-유사 줄기 세포는 태반으로부터 얻어진 상태로 투여될 수도 있고, 또는 탯줄 혈액으로 스파이크 되고 혼합된 세포 조성물로서 투여될 수도 있고, 또는 개체에 투여하기 위한 생리학적으로-허용 가능한 완충액 또는 용액에 넣어질 수도 있다.

[0153] 본 발명은 또한 높은 농도(또는 많은 군)의 균질적 배아-유사 줄기 세포를 가진 약학적 조성물을 포함하는데, 여기에서 하나 이상의 이러한 세포군은 이식 및 다른 용도의 사용을 위하여 다른 줄기 또는 전구 세포와 함께 사용되거나, 또는 다른 줄기 또는 전구 세포와 혼합된 혼합물로서 사용된다. 다른 줄기 또는 전구 세포는 지방 세포형성의, 연골세포형성의 골세포형성의, 조혈, 근육의, 혈관형성의, 신경형성의, 및 간형성의 줄기 세포; 중

간엽 줄기 세포, 스트로말(stromal) 세포, 상피 세포, 간세포, 각질세포, 및 신경, 마엘린, 근육, 혈액, 골수, 피부, 심장, 연결 조직, 폐, 신장, 간, 및 체장(예를 들어 체장 섬 세포)을 포함하지만, 하지만 이에 한정되지 않는, 특정 세포 타입, 조직 또는 장기의 줄기 또는 전구 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0154] 일실시예에서, 본 발명은 높은 농도(또는 많은 군)의 CD34+/CD38-세포; 및 CD34-/CD38-세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 균질적인 조혈 줄기 세포를 가진 약학적 조성물을 제공한다. 하나 이상의 이러한 세포군은 이식 및 다른 용도의 사용을 위해 다른 줄기 세포와 함께, 또는 다른 줄기 세포와 혼합된 혼합물로 사용된다. 특정 실시예에서, 약학적 조성물은 본 발명의 배아-유사 태반 줄기 세포와 예를 들어 CD34+/CD38+ 조혈 세포와 같은 코드 혈액 조혈 세포를 포함한다.
- [0155] 하나 이상의 이러한 세포군은 이식 및 다른 용도의 사용을 위해 CD34+/CD38+ 조혈 세포와 같은 코드 혈액 조혈 세포와 함께, 또는 코드 혈액 조혈 세포와 혼합된 혼합물로 사용된다.
- [0156] 일실시예에서, 본 발명은 배아-유사 태반 줄기 세포를 포함하는 이종 군의 유핵 세포를 제공한다. 특정 실시예에서, 이종 군의 유핵 세포(순수한 군의 CD34+ 세포 배아-유사 태반 줄기 세포 이외에)가 바람직하다.
- [0157] 다른 실시예에서, 본 발명은 세포들의 혼합된 군을 제공 한다 (예를 들어 코드 혈액 세포와 배아-유사 태반 줄기 세포). 혼합된 세포의 군은 얼려질 수도 또는 얼려지지 않을 수도 있다. 그러한 혼합된 군은 예를 들어 하나의 백 또는 하나의 실린지와 같이 한 개의 컨테이너 안에서 보관 및/또는 사용될 수도 있다.
- [0158] 다른 실시예에서, 본 발명은 다른 세포 타입의 둘 이상의 분리된 또는 구별되는 군들을 제공한다 (예를 들어 코드 혈액 세포와 배아-유사 태반 줄기 세포). 각각의 분리된 군들은 한 가지 타입의 세포 또는 세포군을 포함하는 분리된 컨테이너, 예를 들어 한 개의 백 (예를 들어 Baxter, Becton-Dickinson, Medcep, National Hospital Products 또는 Terumo의 혈액 보관 백) 또는 한 개의 실린지와 같은 분리된 컨테이너,로 사용 및/또는 보관될 수도 있다. 이러한 실시예의 일정 측면에서, 본 발명은 투여 전에 혼합되어지는 다른 세포 타입의 분리된 컨테이너를 제공한다. 그러한 세포는 얼려지거나 또는 얼려지지 않을 수 있다.
- [0159] 특정 일실시예에서, 코드 혈액 세포는 하나의 백안에 담겨지고 배아-유사 태반 줄기 세포는 두 번째 백안에 담겨진다.
- [0160] 다른 실시예에서, 본 발명은 동결 전에 "조정된(conditioned)" 배아-유사 태반 줄기 세포를 제공한다.
- [0161] 다른 실시예에서, 배아-유사 태반 줄기 세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 일군의 세포는 표준 방법에 따라서 적혈구 및/또는 과립구를 제거하도록 조정될 수 있다. 이로써 일군의 유핵 세포는 배아-유사 태반 줄기 세포가 풍부하도록 남겨진다. 그러한 풍부한 일군의 배아-유사 태반 줄기 세포는 동결되지 않은 상태로 사용될 수도 있으며, 또는 나중의 사용을 위해 동결될 수도 있다. 일군의 세포가 동결된다면, 표준 저온보존제 (예를 들어 DMSO, 글리세롤, Epilife™ 세포 동결 매질(Cascade Biologics)이 동결 전에 풍부한 일군의 세포에 첨가된다.
- [0162] 다른 실시예에서, 배아-유사 태반 줄기 세포를 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 일군의 세포는 동결되고 해동된 후에 적혈구 및/또는 과립구를 제거하도록 조정될 수도 있다.
- [0163] 본 발명에 따르면, 세포 분화를 유도하는 성분이 일군의 배아-유사 줄기 세포를 조정하기 위하여 사용될 수 있다. 일정 실시예에서, 세포 분화를 유도하는 성분은 컨테이너 안 일군의 세포에 첨가될 수 있다. 그 성분은 Ca²⁺, EGF, α-FGF, β-FGF, PDGF, 케라티노사이트(keratinocyte) 성장 인자(KGF), TGF-β, 시토카인(예를 들어, IL-1α, IL-1β, IFN-γ, TFN), 레티노익 산, 트랜스페린(transferrin), 호르몬(예를 들어, 안드로젠, 에스트로겐, 인슐린, 프로락틴, 트리아이오도티로닌(triiodothyronine), 하이드로코티손, 텍사메타손), 소디움 뷰티레이트, TPA, DMSO, NMF, DMF, 매트릭스 엘리먼트(예를 들어, 콜라겐, 히파란 설페이트, Matrigel™), 또는 그들의 혼합물이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0164] 다른 실시예에서, 세포 분화를 억제하는 성분이 일군의 배아-유사 줄기 세포에 첨가될 수 있다. 일정 실시예에서, 분화를 억제하는 성분이 컨테이너 안의 일군의 세포에 첨가될 수 있다. 그 성분은 인간 델타-1 및 인간 세라이트-1 폴리펩타이드(Sakano 등, 미국특허 제6,337,387호, "분화-억제 폴리펩타이드", 2002년 1월 8일 발행), 백혈병 억제 인자(LIF), 및 줄기 세포 인자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0165] 일정 실시예에서, 하나 이상의 군의 배아-유사 줄기 세포는 그것이 필요한 환자에게 전달된다. 일정 실시예에서, 둘 이상의 군의 신선한 (얼려지지 않은) 세포들이 하나의 컨테이너 또는 단일 전달 시스템으로부터

전달된다.

- [0166] 다른 실시예에서, 둘 이상의 군의 얼려지고 녹여진 세포들이 하나의 컨테이너 또는 단일 전달 시스템으로 전달된다.
- [0167] 다른 실시예에서, 각각의 둘 이상의 군의 신선한 (얼려지지 않은) 세포들이 하나의 컨테이너 또는 단일 전달 시스템으로 옮겨지고, 그리고 그로부터 전달된다. 이러한 실시예의 다른 측면에서, 각 군은 다른 IV 주입 백(예를 들어, Baxter, Becton-Dickinson, Medcep, National Hospital Products 또는 Terumo의 백)으로부터 전달된다. 각 컨테이너(예를 들어 IV 주입 백)의 내용물은 분리된 전달 시스템을 통하여 전달될 수도 있고, 또 각 컨테이너는 "피기백(piggybacked)"일 수도 있어서 그들의 내용물은 하나의 전달 시스템으로부터 전달되기 전에 결합 또는 혼합된다. 예를 들어, 둘 이상의 군의 세포들이 일반적인 흐름 관(예를 들어 튜브) 내로 공급 및/또는 혼합되거나, 그들은 하나의 일반적인 컨테이너(예를 들어 챔버 또는 백) 내로 공급 및/또는 혼합된다.
- [0168] 본 발명에 따르면, 둘 이상의 군의 세포들은 투여 전에, 투여 동안에 또는 투여 시에 또는 전달과 동시에 결합될 수 있다.
- [0169] 일 실시예에서, 최소 1.7×10^7 개의 유핵 세포/kg가 그것이 필요한 환자에게 전달된다. 바람직하게는, 최소 2.5×10^7 개의 유핵 세포/kg가 그것이 필요한 환자에게 전달된다.
- [0170] 일 실시예에서, 본 발명은 객체에게 투여하는 것을 포함하는 객체의 질병 또는 이상을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 여기에서 그러한 치료 또는 예방은 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 배아-유사 줄기 세포, 또는 보충된 세포군이 요구된다.
- [0171] 다른 실시예에서, 본 발명은 객체에게 투여하는 것을 포함하는 객체의 질병 또는 이상을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 여기에서 그러한 치료 또는 예방은 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 배아-유사 줄기 세포가 요구된다.
- [0172] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포는 개별적 경험 염증에 투여될 때 항-염증 효과가 있을 것으로 기대된다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포 또는 보충된 세포군은 염증으로부터 생긴, 또는 염증과 관련된 어떠한 질병, 병태 또는 이상을 치료하도록 사용될 수 있다. 염증은 예를 들어 뇌, 척수 및 말초 신경계; 심 조직을 포함하는 혈관 조직; 췌장; 소장 또는 소화관의 다른 장기; 폐; 신장; 간; 생식 장기; 상피 조직; 또는 내배엽 조직을 포함하는 근육; 신경계와 같이 어떠한 장기 또는 조직에 존재할 수 있다.
- [0173] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포 또는 보충된 세포군은 또한 염증과 관련된 것을 포함하는 자가면역 또는 면역계-관련 이상을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서 일정 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 세포 또는 보충된 세포군의 치료학적으로 유효한 양만큼 그러한 객체에게 투여하는 것을 포함하는 자가면역 질환 또는 병태를 가진 객체를 치료하는 방법을 포함한다. 그러한 질환 또는 이상은 당뇨병, 근육 위축성 측삭 경화증, 중증 근무력증, 당뇨병성 신경병증 또는 루푸스일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 관련된 실시예에서, 본 발명의 배아-유사 줄기 세포 또는 보충된 세포군은 만성 또는 급성 앨리지와 같은 면역-관련 이상을 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0174] 일정 실시예에서, 질환 또는 이상은 본 명세서에서 언급된 모든 질환과 재생불량성 빈혈, 척수형성이상증, 심근경색, 발작 이상, 다발성 경화증, 졸도, 저혈압, 심장 정지, 허혈, 염증, 나이-관련 인식 기능의 손상, 방사선상해, 뇌성 마비, 신경퇴행성 질환, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, Leigh 병, 에이즈, 치매, 기억 상실, 근육 위축성 측삭 경화증(ALS), 허혈 신 손상, 뇌 또는 척수 트라우마, 심장-폐 바이패스, 녹내장, 망막 허혈, 망막 트라우마, 리소좀 축적병, 테이-삭스, 니만-픽(Niemann-Pick), 파브리(Fabry's), 가우셔(Gaucher's), 헌터(Hunter's), 및 허르러(Hurler's) 질환, 다른 갱글리오시드증(gangliosidosis), 점액다당류증(mucopolysaccharidosis), 글리코겐증(glycogenosis), 유전적 대사 이상, 아드레노류코다이스트로피(adrenoleukodystrophy), 낭종섬유증, 글리코겐 축적 질환, 하이퍼티로이디즘(hypothyroidism), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 페아르손(Pearson) 증후군, 폼페 병, 페닐케톤뇨증(phenylketonuria), 포르피리아(porphyrrias), 단풍시럽뇨병, 호노시스틴뇨증(homocystinuria), 점액 다당류증, 만성 육아종 질환 및 티로신혈증 및 테이-삭스(Tay-Sachs) 질환, 암, 종양 또는 다른 병태적 또는 종양적 상태를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0175] 다른 실시예에서, 그 세포들은 트라우마 특히 염증을 포함하는 트라우마로 인한 어떠한 종류의 상해를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 트라우마-관련 병태의 예로는 뇌, 척수, 또는 CNS로 둘러싸인 조직을 포함하는 중

추 신경계(CNS) 상해, 말초 신경계(PNS)의 상해; 또는 신체의 어떠한 일정 부분의 상해를 포함한다. 그러한 트라우마는 사고에 의해 발생할 수 있고, 또는 수술 또는 혈관성형술과 같은 수술적 절차의 정상적 또는 비정상적 결과에 의해 발생할 수도 있다. 트라우마는 예를 들어 졸도 또는 정맥염(phlebitis)과 같은 혈관의 파열 또는 폐색과 관련될 수 있다. 특정 실시예에서, 그 세포는 각막 상피 손상, 연골 조직 치료, 안면 박피술, 점막, 고막, 장 리닝(lining), 신경학적 구조(예를 들어 망막, 기저막의 청각 신경, 후각 상피의 후각신경)의 치료, 피부의 트라우마틱(traumatic) 손상에 대한 화상 및 상처의 회복, 또는 손상 받은 또는 질병이 있는 장기 또는 조직의 재구성을 포함하는, 하지만 이에 한정되지 않는, 자가 조직의 또는 이종 유래의 조직 재생성 또는 재배치 치료 또는 프로토콜에서 사용될 수 있다.

[0176] 특정 실시예에서, 그 질환 또는 이상은 무형성 빈혈, 적수형성이상증(myelodysplasia), 백혈병, 골수 장애 또는 조혈 질환 또는 이상이다. 다른 특정 실시예에서, 객체는 인간이다.

[0177] 다른 실시예에서, 본 발명은 염증으로부터 유래한 또는 염증과 관련된 질환, 이상 또는 병태를 가진 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 신경병적 질환, 이상 또는 병태를 가진 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 보다 구체적인 실시예에서, 상기 신경병적 질환은 ALS이다. 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 신경병적 질환은 파킨슨 병이다. 다른 구체적인 실시예에서, 상기 질환은 혈관 또는 심혈관 질환이다. 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 질환은 동맥경화증이다. 다른 구체적인 실시예에서, 상기 질환은 당뇨병이다.

[0178] 특정 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 전술한 바와 같이 배아-유사 태반 줄기 세포가 첨가된 일정 수의 탯줄 혈액을 포함한다.

[0179] 많은 수의 배아-유사 줄기 세포, 또는 보충된 세포군은, 일단 투여되면, 장기 "콜로니"를 형성하며 숙주 내로 심어질 수 있다. 이것은 본질적으로 키메릭(chimeric)인 숙주를 야기한다. 다른 유전적 문맥들에서 키메리는 일반적으로 더 원기 왕성하고 탄력적이기 때문에, 그러한 키메리즘은 숙주의 건강과 웰-빙을 촉진할 것으로 기대된다. 그러한 것처럼, 배아-유사 줄기 세포는 특정 질환, 이상 또는 병태로 고통 받는 개체에 단순히 투여될 수 있을 뿐 아니라, 개체의 총괄적 건강과 웰-빙을 증가시킬 목적으로 개체에 투여될 수도 있다.

[0180] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포 또는 보충된 세포군은 개체에 투여되기 전에 TNF- α 의 활성을 조절하는 화합물을 가지고 처리될 수 있다. 그러한 화합물들은 동시-계류중인 미국특허 가출원 제60/372,348호, 2002년 4월 12일 발행,에 잘 설명되어 있다, 이로써 상기 인용문헌은 그 인용에 의하여 그 전체가 본 명세서 안에 포함된다. 바람직한 화합물은 IMiDs와 SelCids이고, 보다 바람직한 화합물은 Actimid™과 Revimid™라는 상표명으로 이용 가능한 물질이다.

[0181] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포의 특별히 유용한 측면은, 일정 실시예에서, 투여 전에 세포의 HLA-타입을 검사할 필요가 없다는 것이다. 즉, 배아-유사 줄기 세포는 이종 유래의 공여자, 또는 복수개의 이종 유래의 공여자로부터 얻어질 수 있고, 그러한 세포가 필요한 개체에게 이식되고, 이식된 세포는 숙주 내에서 무한정하게 남아 있다. HLA 타이핑에 대한 필요성의 제거는 이식 절차 그 자체와 이식을 위한 공여자의 확인 과정을 모두 매우 촉진한다. 그러나 그것들을 포함한 배아-유사 줄기 세포 또는 보충된 세포군은 투여 전에 공여자와 수여자 간에 HLA가 일치될 수도 있다.

[0182] 발명자들은 이러한 세포들을 선적응시키면 배아-유사 줄기 세포 또는 보충된 세포군을 이용한 개체의 치료효율이 높아진다는 것을 발견하였다. 선적응(preconditioning)은 일정 시간 동안 -5-23°C, 0-10°C, 또는 바람직하게는 4-5°C에서 가스-통과 컨테이너에 세포를 보관하는 것을 포함한다. 그 기간은 18시간 내지 21일, 48시간 내지 10일이고, 바람직하게는 3-5일이다. 세포는 선적응 전에 저온보관될 수도 있고, 또는 바람직하게는 투여 전에 즉시 선적응된다.

[0183] 따라서, 일 실시예에서, 본 발명은 적어도 하나의 공여자로부터 수집된 배아-유사 줄기 세포를 상기 개체에 투여하는 것을 포함하는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 여기에서 사용된 용어 "공여자(donor)"는 성인, 어린이, 유아, 또는 바람직하게는 태반을 의미한다. 다른 바람직한 실시예에서, 본 방법은 복수개의 공여자로부터 얻어지고 모아진 배아-유사 줄기 세포를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시예에서 상기 배아-유사 줄기 세포는 복수개의 공여자에서 얻어진 줄기 세포이다. 복수의 공여자로부터 수집되는 경우, 투여량 유닛, 여기에서 "투여량 유닛"은 하나의 공여자로부터 얻어진 수집물이다, 투여 전에 모아질 수 있고, 연속적으로 투여될 수도 있으며, 또는 택일적으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포는 탯줄 혈액과 혼합되거나, 또는 탯줄 혈액에 스파이크된다. 그리고 혼합물은 개체에게 투여된다. 본 방법의 더 구체적인 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포와 탯줄 혈액의 비율은 총 유핵 세포의 수를 기준으로 적어도

20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30 또는 80:20이다.

[0184] **줄기 세포의 투여: 투여량**

[0185] 본 발명의 특별히 유용한 측면은 개체에게 높은 용량의 줄기 세포의 투여이다; 그러한 수의 세포는 그들이 유래된 물질(예를 들어, 골수 또는 코드 혈액)보다 훨씬 효과적이다. 이러한 문맥에서, "높은 용량"은 예를 들어 골수 이식에서 투여되는 것 보다 5, 10, 15 또는 20 또는 그 이상 배수의 총 유핵 세포를 나타낸다. 여기에서 유핵 세포는 줄기 세포, 특히 배아-유사 줄기 세포를 포함한다. 일반적으로, 예를 들어 골수 이식을 위한, 줄기 세포 주입을 받는 환자는 한 유닛의 세포를 받는다. 여기에서 한 유닛은 약 1×10^9 개의 유핵 세포(이는 $1-2 \times 10^8$ 개의 줄기 세포에 대응함)이다. 높은 용량 치료를 위해서, 그러므로, 환자는 30억, 50억, 100억, 150억, 200억, 300억, 400억, 500억 또는 그 이상, 또는 대안적으로 3, 5, 10, 20, 30, 40, 또는 50 유닛 또는 그 이상의 총 유핵 세포, 즉 배아-유사 줄기 세포 단독, 또는 배아-유사 줄기 세포가 스파이크된 다른 줄기 또는 전구 세포군을 투여받는다 (즉 배아-유사 줄기 세포가 스파이크된 탯줄 혈액).

[0186] 보다 바람직한 실시예에서, 예를 들어, 개체는 스파이크된 코드 혈액 약 15 유닛이 주어지는데, 이 유닛은 약 7.5억개의 코드 혈액 세포와 5억개의 배아-유사 줄기 세포를 포함하고 있다. 따라서, 일실시예에서, 개체에게 투여된 유핵 세포의 수는 골수 대체에서 일반적으로 투여되는 세포의 수의 적어도 5배 이상이다. 본 발명의 다른 특정 실시예에서, 개체에게 투여된 유핵 세포의 수는 골수 대체에서 일반적으로 투여되는 세포의 수의 적어도 10배 이상이다. 본 발명의 다른 특정 실시예에서, 개체에게 투여된 유핵 세포의 수는 골수 대체에서 일반적으로 투여되는 세포의 수의 적어도 15배 이상이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 개체에게 투여되는 줄기 세포를 포함하는 유핵 세포의 총 수는 신체 무게 kg당 $1-100 \times 10^8$ 이다. 다른 실시예에서, 투여되는 유핵 세포의 총 수는 적어도 50억 개이다. 다른 실시예에서, 투여되는 유핵 세포의 총 수는 적어도 150억 개이다.

[0187] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포와 상기 코드 혈액은 상기 개체에 투여 전에 즉시 (즉, 투여 5분 이내) 혼합된다. 다른 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포와 상기 코드 혈액은 상기 개체에 투여 전 5분 이상의 시간의 시점에서 혼합된다. 본 방법의 다른 실시예에서, 배아-유사 줄기 세포는 저온보관 되고, 상기 개체에게 투여 전에 해동된다. 다른 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포와 상기 코드 혈액은 상기 개체에게 투여 전 24시간 이상의 시점에서 보충된 세포군을 형성하도록 혼합된다. 여기에서 상기 보충된 세포군은 저온보관 되고 상기 투여 전에 해동된다. 다른 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포 및/또는 보충된 세포군은 여러 번에 걸쳐 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포 및/또는 보충된 세포군은 투여 전 18시간 내지 21일 동안 보관되어 전조정(preconditioned)된다. 다른 특정 실시예에서, 그 세포는 투여 전 48시간 내지 10일 동안 보관되어 전조정된다. 바람직한 특정 실시예에서, 상기 세포는 이식 전 3-5일 동안 전조정된다. 여기의 어떠한 방법들의 바람직한 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포는 개체에게 투여 전에 HLA 타입이 조사되지 않는다.

[0188] 본 방법의 다른 특정 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포는 주로 (즉 50% 이상) CD34+ 세포이다. 본 방법의 다른 특정 실시예에서, 상기 배아-유사 줄기 세포는 주로 CD34+33+ 줄기 세포이다.

[0189] 배아-유사 줄기 세포 또는 그들을 포함하는 보충된 세포군을 이용한 개체의 치료적 또는 예방적 치료법은 질병, 이상 또는 병태가 어떠한 방법으로도 측정가능하게 향상된다면 효과적인 것으로 생각될 수 있다. 그러한 향상은 여러 가지 지표에 의해 나타날 수도 있다. 측정 가능한 지표는 예를 들어 특정 질환, 이상 또는 병태와 관련된 생리적 상태 또는 일련의 생리적 상태들의 검출 가능한 변화를 포함 한다 (이러한 변화는 혈압, 심박, 호흡율, 다양한 혈액 세포 타입의 수, 일정 단백질의 혈액 내 수치, 탄수화물, 리피드 또는 시토카인 또는 질병, 이상 또는 병태와 관련된 유전적 마커들의 조절 발현을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다). 다양한 지표들에 대한 정상 수치는 본 발명이 속한 분야에서 잘 알려진 정상 범위에 의해 설정될 수 있거나, 또는 컨트롤과 그러한 수치들의 비교에 의해 설정될 수 있다. 의학 과학에서, 치료효율은 또한 종종 개인의 느낌과 건강의 개인의 상태의 주관적 느낌에 의하여 특성 지워진다. 그러므로 본 발명의 줄기 세포 또는 보충된 세포군의 투여 후에 나타나는 개선은 또한 개체의 주관적 개선 느낌, 증가된 웰-빙, 증가된 건강 상태, 개선된 에너지 레벨, 또는 그와 유사한 것과 같은 주관적 지표에 의해 특성 지워진다.

[0190] 본 발명의 배아-유사 줄기 세포와 보충된 세포군은 주사 또는 트랜스퓨전(transfusion)에 의한 방법을 포함하는 어떠한 약학적으로 또는 의학적으로 허용되는 방식으로 환자에게 투여될 수 있다. 그 세포 또는 보충된 세포군은 후술하는 약학적으로 허용 가능한 운반체를 포함하거나 또는 그 운반체 안에 포함될 수 있다. 배아-유사 줄

기 세포 또는 보충된 세포군은 예를 들어 혈액 백, 트랜스퍼 백, 플라스틱 튜브 또는 바이알과 같은 어떠한 약학적으로 또는 의학적으로 허용 가능한 컨테이너로 운반, 컨테이너 안에 보관, 또는 수송될 수 있다.

키트

- [0191] **키트**
- [0192] 본 발명은 또한 본 발명의 약학적 조성물의 하나 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 컨테이너를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 선택적으로 다음과 같은 것들이 그러한 컨테이너와 관련된다: 세포 배양의 위한 기구, 세포 배양 매질 또는 하나 이상의 세포 배양 매질의 성분으로 채워진 하나 이상의 컨테이너, 예를 들어 본 발명의 조성물의 정맥 주사를 위한 도구와 같은 본 발명의 조성물의 전달에 사용하기 위한 도구, 및/또는 약제 또는 생물학적 생산물의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기구에 의해 규정된 형태의 노티스(설명서), 그 노티스는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 기구에 의한 허가를 의미한다. 특정 실시예에서, 키트는 위에서 설명된 것과 같이 탯줄 혈액과 같은 줄기 세포로 채워진 하나 이상의 다른 컨테이너와 본 발명의 배아-유사 줄기 세포로 채워진 하나 이상의 컨테이너를 포함한다.
- [0193] 다른 실시예에서, 키트는 하나의 백 또는 컨테이너 내에 함유된 예를 들어 코드 혈액 세포와 같은 배아-유사 줄기 세포로 보충된 줄기 세포의 혼합물을 포함한다. 다른 실시예에서, 키트는 두개의 분리된 백 또는 컨테이너에 포함된 일군의 코드 혈액 세포와 일군의 배아-유사 줄기 세포를 포함한다. 일정 실시예에서, 키트는 코드 혈액 세포를 함유한 백과 배아-유사 줄기 세포를 함유한 백이 그것이 필요한 환자에게 투여 전에, 투여 시에 혼합되는 "두개의 백" 조성물을 포함한다. 다른 실시예에서, 키트는 일군의 코드 혈액 세포와 일군의 배아-유사 줄기 세포가 포함된 두개의 분리된 백 또는 컨테이너를 함유하는데, 이것들은 환자에게 분리되어 (예를 들어 동시에 또는 순차적으로) 투여되며 두 세포군의 혼합은 *in vivo*에서 발생한다.
- [0194] 다른 실시예에서, 키트는 투여 전에 물리적으로 혼합되는 일군의 코드 혈액 세포와 일군의 배아-유사 줄기 세포를 제공한다. 이러한 실시예의 다른 측면에서, 키트는 예를 들어 GM-CSF, IL-4, Flt3L, CD40L, IFN-alpha, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-2, IL-6, 레티노익 산, 기초 섬유아세포 성장 인자, TGF-beta-1, TGF-beta-3, 간세포 성장 인자, 상피 성장 인자, 카르디오토로핀-1, 안지오텐시노겐, 안지오텐신 I(AI), 안지오텐신 II(AII), AII AT₂ type 2 수용체 작용제, 또는 그 유사체 또는 그의 단편과 같은 성장 인자를 포함한다. 이러한 실시예의 다른 측면에서, 환자에게 투여 전에 두개 군은 물리적으로 혼합되고, 그 후 세포 분화를 유도하기 위하여 키트 안에 포함된 성장 인자로 처리된다. 이러한 실시예의 다른 측면에서, 코드 혈액 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포는 환자에게 투여 전에 세포 분화를 유도하기 위하여 키트 안에 포함된 성장 인자로 처리되고, 그 후 물리적으로 혼합된다.
- [0195] 다음의 실시예는 좀더 구체적 설명을 위해 예시적 수단으로 제공되는 것으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

실시예

- [0196] -실시예 1-
- [0197] 배수(drain)된 태반의 관류통과액(perfusate)로부터 회수된 세포 타입의 분석
- [0198] 본 실시예는 본 발명의 방법에 따라서 배양된 태반의 용출된 관류통과액으로부터 회수된 세포 타입들의 분석을 설명한다. 20ml의 인산 버퍼 식염수(PBS)를 관류액에 첨가하고 10ml 부분을 모아서 3000 rpm(분당 회전수)에서 25 분동안 원심 분리를 하였다. 상기 용출액을 4개의 튜브로 나누어 얼음 배쓰에 놓았다. 2.5 ml의 PBS내의 1% 태아 송아지 혈청(fetal calf serum;FCS) 용액을 튜브에 첨가하고 그 튜브를 140 분 x 10 g (중력에 기인한 가속)의 조건으로 원심분리하였다.
- [0199] 5 ml의 1% FCS내에 상기 펠렛을 재부유하고 두 튜브를 혼합하였다. 전체 모노뉴클레오사이트들(mononucleocytes)은 전체 림파구와 전체 다핵구를 더하여 계산하였고 그 다음에 그 결과에 전체 세포 부유 부피를 곱하였다.
- [0200] 하기 표는 상기에서 언급한 방법에 따라 배양된 태반의 관류에 의하여 얻은 세포 타입들을 나타낸다.
- [0201]

WBC	<u>Lym% MID%GRA%전체 부피 세포 수</u>
-----	--------------------------------

- [0202] 1000/ml
- [0203] 제대혈(CB) 10.5 43.2 8 48.8 60 ml 6.3 X 10⁸
- [0204] 태반관류액(상온) 12.0 62.9 18.2 18.9 15 ml 1.8 X 10⁸
- [0205] 태반관류액(37℃) 11.7 56.0 19.2 24.8 30 ml 3.5 X 10⁸
- [0206] 상기 표에서 태반 관류액의 샘플은 피콜(Ficoll) 후이고, 피콜 후 태반 관류액의 전체 세포수는 5.3 X 10⁸ 이고, 가공 전의 제대혈의 세포수는 6.3 X 10⁸ 이다. Lym %는 림파구의 퍼센트를 나타내고; MID%는 백혈구의 중간범위(midrange)의 퍼센트를 나타내고; GRA%는 과립구(granulocyte)의 퍼센트를 나타낸다.
- [0207] -실시예 2
- [0208] 태반의 배양 및 관류에 의해 얻은 세포들의 분석
- [0209] 하기 실시예는 본 발명의 방법에 따라 태반의 배양 및 관류에 의해 얻은 세포들의 분석을 기술한다.
- [0210] 1. 재료 및 방법
- [0211] 사적 제대혈 बैं킹 프로그램에 등록된 임산부로부터 태반 기증자들을 모집하고 연구 목적을 위해 제대혈액의 회수에 따르는 모든 피를 뺀 태반의 용도를 인정하는 고지에 입각한 동의를 제공받았다. 기증자 데이터는 비밀일 것이다.
- [0212] 이 기증자들은 또한 저온 보존을 위하여 그들의 제대혈 견본들의 정상 상태 처리로부터 만들어진 브라인드된 자료의 용도를 인정하였다.
- [0213] 본 실험 방법을 사용하여 회수된 용출 관류액 및 모아진 제대혈 조성물 사이의 이 허락된 비교는 하기에서 설명한다.
- [0214] 탯줄과 태반으로부터 제대혈의 방혈 후에 실온에서 저장되고 4에서 24 시간 내에 실험실에 전달하였고, 상술한 방법에 따라서 태반은 실온에서 살균되고, 격리된 컨테이너에 위치하고 출생 4 시간 내에 실험실에 전해졌다.
- [0215] 조사에 의해 만약 태반이 기관의 절단 또는 탯줄 맥관의 상처와 같은 물리적인 상해가 있는 경우에는 태반을 폐기하였다.
- [0216] 태반들은 실온(23±2℃)에서 유지되거나 2에서 20 시간동안 살균된 컨테이너들에서 냉장(4℃)되었다. 정기적으로, 태반들은 어떠한 유형의 표면 혈액 또는 파편을 제거하기 위하여 25±3℃에서 살균된 식염수에 담그고 세척하였다. 탯줄은 태반속으로 그것의 삽입으로부터 대략 5cm 가량 가로로 절개되었고, 탯줄 도관은 태반의 양방향 관류 및 용출액의 회수를 가능케하는 살균된 액체 경로와 연결된 TEFLON[®] 또는 폴리프로필렌 카테터들로 캐눌러화(cannulate)하였다.
- [0217] 상기에서 서술된 방법은 태반 조건화, 관류 및 용출 수집이 혈관내 압력 및 유속, 코어 및 관류액 온도 및 회수된 용출액 부피의 실시간 모니터링 뿐 아니라 조절된 주위 압력 조건 하에서 수행하게 하였다.
- [0218] 조건화된 프로토콜의 범위는 산후 기간 24 시간동안 평가받았고, 용출액의 세포 조성은 유동 세포 분석법, 광현미경법 그리고 콜로니 형성 단위 분석에 의하여 분석되었다.
- [0219] 2. 태반 조건화(conditioning)
- [0220] 기증자 태반들은 배달 후에 12에서 24 시간 내에 실온에서 처리되었다.
- [0221] 처리 전에, 막들을 제거하고 어미 부위는 잔여 혈액의 소체를 세척하였다. 태(umbilical) 도관은 혈액 샘플 수집을 위하여 20 게이지 버퍼플라이 바늘 사용으로 만들어진 카테터들과 캐눌러화(cannulated)하였다.
- [0222] 기증자 태반들은 잔여 배아-유사 줄기 세포들의 모집 및 증식을 위하여 생리학적으로 양립 가능한 환경을 시뮬레이션하고 유지하기 위한 시도로 5-37℃, 5 % CO₂, pH 7.2에서 7.5, 바람직하게는 pH 7.45와 같은 다양한 조건 하에서 유지되었다.
- [0223] 캐눌러를 2U/ml 헤파린(Elkins-Sinn, 뉴저지)을 포함하는 IMDM 혈청 없는 배지(GibcoBRL, 뉴욕)으로 공급

(flush)하였다.

- [0224] 대략 150 ml의 관류액(perfusate)이 모아졌을 때까지 분당 50 ml의 속도로 태반의 관류를 계속하였다. 이 관류액의 용기에 "초기 분획"이라고 표시하였다.
- [0225] 동일한 속도로 태반의 관류를 계속하여 약 150ml의 두번째 분획을 수집하여 "후기 분획"이라고 표시하였다. 실험 과정 동안 세포 물질의 회수를 돕고 관류 공정을 돕기 위하여 태반을 부드럽게 마사지하였다. 동맥 캐놀러를 통한 중력 배수(drainage)와 흡출(aspiration)을 통하여 관류 회로부터 용출액을 수집하였다.
- [0226] 다음 태반들은 헤파린처리(2U/ml)된 Dulbecco의 변형 이글 배지(H. DMEM)로 15 ml/분의 속도로 10분간 관류하고, 관류액을 1시간내에 어미 자리(maternal site)로부터 수집하여 유핵세포들의 수를 카운트하였다.
- [0227] 관류와 수집 과정은 유핵세포들 수가 100/ml 이하로 낮아질 때까지 1회 또는 2회 반복하였다.
- [0228] 관류액들은 모으고 혈소판, 세포 파편 및 무핵 세포막들을 제거하기 위하여 가볍게 원심분리하였다.
- [0229] 다음 유핵 세포들은 피콜(Ficoll)-하이파크(Hypaque) 밀도차 원심분리에 의해 분리하고 세척 후에 Dulbecco의 변형 이글 배지내에 재부유하였다.
- [0230] 부착된 세포를 분리하기 위하여, $5-10 \times 10^6$ 세포 분취량(aliquot)들을 몇몇 T-75 플라스크들 각각에 위치시키고 BioWhittaker로부터 얻은 상업적으로 구할 수 있는 간엽모세포 성장 배지(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium;MSCGM)로 배양하고 조직 배양 인큐베이터(37°C, 5% CO₂)에 위치시켰다.
- [0231] 10에서 15일 후에, 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하여 제거하고 MSCGM에 의하여 대체하였다.
- [0232] 플라스크들을 여러 부착된 세포 타입들의 존재 및 특히 섬유아세포 유사(fibroblastoid) 세포들의 군의 동정 및 확장을 위하여 매일 조사하였다.
- [0233] 3. 세포 회수 및 분리
- [0234] 세포들은 실온에서 15 분동안 5000 x g에서 원심분리에 의해 관류액으로부터 회수하였다.
- [0235] 이 과정은 오염된 세포 파편과 혈소판으로부터 세포들을 분리하는 작용을 한다.
- [0236] 세포 펠렛들을 2U/ml 헤파린 및 2mM EDTA(GibcoBRL, 뉴욕)을 포함하는 IMDM 혈청 결핍 배지로 재부유하였다.
- [0237] 전체 단일핵(mononuclear) 세포 분획은 제조업자에 의하여 추천된 과정에 따라 Lymphoprep(Nycomed Pharma, 노르웨이 오슬로)을 사용하여 분리하였고, 단일 핵 세포 분획을 재부유하였다. 세포들은 헤마타사이토미터를 사용하여 카운트하였다.
- [0238] 생존수는 트리판 블루 제외에 의하여 평가하였다.
- [0239] 간엽 세포들의 분리는 0.2 % EDTA(시그마, 세인트루이스 MO)을 갖는 0.05 % 트립신 용액을 사용한 "차별적인 트립신화(differential trypsinization)"를 통하여 달성하였다.
- [0240] 차별적인 트립신화는 섬유아세포 유사 세포들이 약 5분 내에 플라스틱 표면으로부터 떨어지고 다른 부착된 군들은 20에서 30 분 이상 배양이 필요하기 때문에 가능하다.
- [0241] 떨어진 섬유아세포 유사 세포들을 트립신처리 후에 모아서 트립신 중화 용액(TNS, BioWhittaker)을 사용하여 트립신 중화하였다.
- [0242] 세포들을 H.DMEM으로 세척하고 MSCGM에 재부유하였다.
- [0243] Becton-Dickinson FACSCalibur 기구를 사용하여 유동 세포 분석법을 실행하였고, 골수 유래 MSC(간엽모세포들)에 대한 공지의 마커에 기초하여 선택된 FITC와 PE 표지된 단일 클론 항체(mAb)은 B.D. 및 Caltag 실험실(남 샌 프란시스코, CA.)로부터 구입하였고 그들의 배양된 상등액내의 mAbs의 반응성은 FITC 또는 PE 표지된 F(ab)' 2 염소 항-마우스 항체에 의하여 검출되고 SH2, SH3 및 SH4 항체를 생산하는 하이브리도마들을 얻었다.
- [0244] 세포 계통 분화(lineage differentiation)는 상업적으로 구입할 수 있는 유도를 사용하여 수행하였고, 제조업자의 지시에 따라 유지 배양 배지(BioWhittaker)를 사용하였다.
- [0245] 4. 태반 배아-유사 줄기 세포의 분리

- [0246] 배양 플라스크들에 붙은 세포들의 현미경적인 조사는 형태학적으로 다른 세포 타입들을 나타냈다.
- [0247] 스핀들 형태의 세포들, 큰 핵들과 여러 핵주위에 작은 포(vacuoles)을 갖는 원형 세포, 여러 돌기를 갖는 별 모양의 세포들(별 모양의 세포들의 하나를 통하여 플라스크에 고착되었 있는)이 배양 플라스크들에 부착되어 관찰되었다.
- [0248] 비록 이 부착된 세포들을 추가적으로 특성화하기 위한 어떤 시도도 시도되지 않았지만 유사한 세포들은 골수의 배양, 코트 그리고 말초 혈액에서 관찰되었고, 따라서 자연적인 비-줄기 세포-유사한 것으로 간주하였다.
- [0249] 군으로서 지속되며 나타나는 섬유아세포 유사(fibroblastoid) 세포들은 MSC(간엽모세포)인 것에 대한 후보자였고, 차별적인 트립신처리에 의하여 분리하였고, 제2 플라스크들에서 서브배양하였다.
- [0250] 트립신처리 후에 원형 세포들의 위상 현미경 분석은 이들 세포들이 매우 과립화되어 있고, 실험실에 만들어 내었거나 BioWhittaker로부터 구입한 골수 유래 MSC와 구별할 수 없을 정도라는 것을 나타냈다.
- [0251] 서브배양하였을 때, 태반 유래 배아-유사 줄기 세포들은, 그들의 초기 단계와 대조적으로 수 시간내에 부착하였고, 독특한 섬유아세포 유사 모양을 나타냈고, 대조 골수 유래 MSC와 동일한 성장 패턴을 나타내었다.
- [0252] 게다가 서브 배양과 재공급(refeeding) 동안 느슨하게 결합된 단일 핵 세포들은 외부로 씻겨졌고 배양은 어떠한 유형의 비 섬유아세포 유사 세포 오염물질이 없고 균일한 상태를 유지하였다.

[0253] 5 .결과

- [0254] 초기 및 후기 분획 정제된 단일핵 세포들에 대한 CD-34, CD-38, 및 다른 줄기세포 관련 세포 표면 마커들의 발현은 유동 세포 분석법에 의하여 평가하였다.
- [0255] 회수되고, 분리된 세포들은 PBS로 세척된 후 항 CD34 피코에리트린(phycoerythrin)과 항-CD38 플루어레신 아이소싸아나이트(isothiocyanate)(Becton Dickinson, 마운틴 뷰, 캘리포니아)로 이중 염색하였다.
- [0256] 세포 분리는 예를 들면 자동 Mac(Miltenyi)과 같은 자기 세포 분리를 사용하여 수행하였다. 바람직하게는 CD 34+ 세포 분리를 먼저 수행한다.
- [0257] -실시예 3-
- [0258] 관류 배지(PERFUSION MEDIUM)
- [0259] 하기 실시예는 분리된 태반의 배양을 위한 바람직한 관류액 용액의 조성을 제공한다.

[0260]

화합물	원(Source)	스탁 농도	최종 농도	500ml
DMEM-LG	지브코BRL 11885-084			300ml
MCDB201	시그마M-6770	물로 용해	pH 7.2 필터	200ml
FCS	하이클론	100%	2%	10ml
ITS	시그마 I-3146 또는 지브코BRL 41400-045	100x	1x	5ml
Pen&Strep	지브코BRL 15140-122	100x	1x	5ml
LA+BSA	시그마+지브코BRL BSA	100x(1µg/ml의 LA)	10ng/ml의 LA	5ml
Dexamethasone	시그마 D-2915	0.25mM(in 물)	0.05 µM	100µl
L-아스코르빈산	시그마 A-8960	1000x(100mM)	1x(0.1mM)	500µl
PDGF(50µg)	R&D	4mM HCl+0.1% BSA 내의 10µg/ml	10ng/ml	500µl
EGF(200µg)	시그마 E-9644	10mM HAc+0.1% BSA 내의 10µg/ml	10ng/ml	500µl

- [0261] 상기 조성물은 태반을 관류하기 위하여 다양한 온도에서 사용할 수 있는 관류액이다. 항생제, 항응고제, 다른 성장 인자와 같은 부가적인 성분들이 상기 관류액 또는 배양 배지에 사용될 수 있음을 주지해야 한다.

[0262] -실시예 4-

- [0263] 특정 세포타입으로 분화의 유도

- [0264] 코드 혈구들 및/또는 배아-유사 줄기 세포들을 성장 인자에 노출시켜 특정 세포 타입으로 분화를 유도하였다.
- [0265] 유도를 야기하는데 사용된 성장인자들은 GM-CSF, IL-4, Flt3L, CD40L, IFN-알파, TNF 알파, IFN-감마, IL-2, IL-6, 레티노익 산, 염기성 섬유아세포 성장 인자, TGF-베타-1, TGF-베타-3, 간세포 성장 인자, 표피 성장 인자, 카디오토프린(cardiotropin)-1, 안지오텐지노겐(angiotensinogen), 안지오텐진 I(AI), 안지오텐진 II(AII), AII AT₂ 타입 2 수용체 작용제 또는 유사체 또는 그것의 절편을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0266] 1. 뉴우런으로 분화 유도
- [0267] 본 실시예는 코드 혈구 및/또는 배아-유사 줄기 세포들이 뉴우런으로 분화를 서술한다.
- [0268] 하기 프로토콜은 뉴우런 분화를 유도하기 위하여 이용된다.
- [0269] 1. 태반 줄기 세포들을 DMEM/20 % FBS와 1 mM 베타-메르캅토에탄올로 이루어진 예비유도(preinduction) 배지에서 24시간 성장시켰다.
- [0270] 2. 예비유도 배지를 제거하고 세포들을 PBS로 세척하였다.
- [0271] 3. DMEM 및 1-10 mM 베타-메르캅토에탄올로 이루어진 뉴우런 유도 배지를 첨가하였다. 대안적으로 DMEM/2%DMSO/200 μM 부틸레이트된 하이드록시애니솔(hydroxyanisole)로 이루어진 유도 배지를 뉴우런 분화 효율성을 증가시키는데 사용할 수 있다.
- [0272] 4. 특정한 예에서 혈청-결핍 배지 및 베타-메르캅토에탄올에 노출 후 60분 정도의 초기에 형태학상 그리고 분자 수준의 변화가 일어날 수도 있다(Woodbury 등, J. Neurosci. Res., 61: 364-370). 예컨대 신경 성장 인자 수용체 및 신경미세섬유 중쇄 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 RT/PCR이 사용될 수 있다.
- [0273] 2. 지방세포로의 분화의 유도
- [0274] 본 실시예는 코드 혈액 세포 및/또는 배아-유사 줄기 세포를 지방세포로 분화하는 것을 유도하는 것을 서술한다. 하기 프로토콜은 지방세포 분화를 유도하는데 이용된다.
- [0275] 1. 태반 줄기 세포들은 MSCGM(Bio Whittaker) 또는 15 % 코드 혈청이 공급된 DMEM 내에서 성장한다.
- [0276] 2. 3 사이클의 유도/유지가 사용된다.
- [0277] 각각의 사이클은 태반 줄기 세포들을 지방세포분화 유도 배지(Bio Whittaker)로 공급하고 37°C, 5% CO₂에서 3일 동안 세포들을 배양하고, 지방세포분화 유지 배지(Bio Whittaker)에서 1에서 3일간 배양하였다. 유도 배지는 1 μM 텍사메서손, 0.2 mM 인도메타신, 0.01 mg/ml 인슐린, 0.5 mM IBMX, DMEM-고 포도당, FBS, 및 항생 물질을 포함한 것을 사용하였다.
- [0278] 3. 유도/유지의 완전한 3 사이클 후에, 세포들은 2에서 3 일마다 배지를 바꾸어주면서 추가적인 7 일 동안 지방세포분화 유지 배지에서 배양하였다.
- [0279] 4. 지방세포분화는 지용성 염색제인 오일 레드 O를 사용하며 쉽게 관찰될 수 있는 다수의 원형질내(intracytoplasmic) 지질 소포의 발생에 의하여 측정될 수 있다.
- [0280] 지방분해효소 및 지방산 결합 단백질 유전자의 발현을 조사하기 위하여 RT/PCR 분석을 이용한다.
- [0281] 3. 콘드로사이트로 분화의 유도
- [0282] 본 실시예는 코드 혈구들 및/또는 배아-유사 줄기 세포들을 콘드로사이트로 분화를 유도하는 것을 서술한다.
- [0283] 하기 프로토콜은 콘드로사이트 분화를 야기하기 위하여 이용된다 : 1 .
- [0284] 1. 태반 줄기 세포들을 MSCGM(Bio Whittaker) 또는 15 % 코드 혈청이 보충된 DMEM내에서 유지하였다.
- [0285] 2. 태반 줄기 세포들을은 살균된 폴리프로필렌 튜브로 분취하였다.
- [0286] 세포들을 150 x g로 5분 동안 원심 분리하여 불완전한 콘드로사이트분화(Chondrogenesis) 배지(Bio Whittaker)로 2회 세척하였다.
- [0287] 3. 최종 세척 후에, 세포들을 0.01 μg/ml TGF-베타-3을 포함하는 완전한 콘드로사이트분화(Chondrogenesis) 배

지(Bio Whittaker)에 5 x 10⁵ 세포/ml의 농도로 재부유하였다.

- [0288] 4. 0.5 ml의 세포들은 15 ml 폴리프로필렌 배양 튜브로 분취(aliquot)하였다.
- [0289] 그 세포들을 5 분동안 150 x g에서 펠렛화하고 펠렛은 배지내에 원상태로 남겨 두었다.
- [0290] 5. 느슨하게 캐핑된 튜브를 37℃, 5 % CO₂에서 24시간 배양하였다.
- [0291] 6. 세포 펠렛들을 매 2에서 3 일 마다 신선하게 제조된 완전한 콘드로사이트분화(Chondrogenesis) 배지를 공급하였다.
- [0292] 7. 펠렛들을 저속 볼텍스를 사용하여 매일 교반하면서 배지내에 부유 상태를 유지하였다.
- [0293] 8. 연골 세포 펠렛을 14에서 28 일 배양 후에 수확하였다.
- [0294] 9. 연골세포분화(Chondrogenesis)는 예를 들면 에조이노필릭(esoinophilic) 기질(ground substance) 생산관찰, 세포 형태 관찰 및/또는 콜라겐 2 및 콜라겐 9 유전자 발현을 관찰하기 위한 RT/PCR에 의해 규명될 수 있다.
- [0295] 4. 골세포(osteocytes)로 분화 유도
- [0296] 본 실시예는 코드 혈구들 및/또는 배아-유사 줄기 세포들이 골세포로의 유도를 서술한다.
- [0297] 다음 프로토콜은 골원성(osteogenic) 분화를 야기하기 위하여 이용된다.
- [0298] 1. 태반 줄기 세포들의 부착 배양은 MSCGM(Bio Whittaker) 또는 15 % 코드 혈청이 보충된 DMEM에 배양된다.
- [0299] 2. 배양들은 조직배양 플라스크들에서 24 시간동안 쉰다.
- [0300] 3. 골원성 분화는 0.1 μM 텍사메서손, 0.05 mM 아스코르빈 산-2-인산, 10 mM 베타 글리세로인산을 포함하는 골원성 유도 배지(Bio Whittaker)로 MSCGM을 대체하여 유도한다.
- [0301] 4. 세포들을 2-3주 동안 매일 3에서 4 일마다 골원성 유도 배지를 공급하였다.
- [0302] 5. 분화는 칼슘 특이적인 염색 및 알칼리 포스파타아제와 오스테오폰틴(osteopontin) 유전자 발현에 대한 RT/PCR을 사용하여 분석하였다.
- [0303] 5. 간세포(Hepatocytes)로 분화 유도
- [0304] 본 실시예는 코드 혈구들과 배아-유사 줄기 세포들의 간세포로의 분화 유도를 설명한다.
- [0305] 다음 프로토콜은 간원성(hepatogenic) 분화를 야기하기 위하여 이용된다. 1. 태반 줄기 세포들은 간세포 성장 인자, 20ng/ml 및 상피 성장 인자(100 ng/ml) 으로 보충된 DMEM/20 % CBS에 배양된다. 닉아웃 혈청 대체는 FBS 대신 사용될 수 있다.
- [0306] 2. IL-6 50 ng/ml를 유도 플라스크들에 첨가한다.
- [0307] 6. 췌장 세포들로 분화 유도
- [0308] 본 실시예는 코드 혈구들 및/또는 배아-유사 줄기 세포들의 췌장 세포들로 분화를 설명한다.
- [0309] 다음 프로토콜은 췌장 분화를 야기하기 위하여 이용된다.
- [0310] 1. 태반 줄기 세포들을 염기성 섬유아세포 성장인자(10ng/ml)와 트랜스포밍 성장 인자 베타-1(2 ng/ml)으로 보충된 DMEM/20% CBS에서 배양하였다. 닉아웃 혈청 대체품은 CBS의 대신에 사용될 수도 있다.
- [0311] 2. 네스틴(nestin)-양성 신경단위 세포 배양들로부터 온 조건화된 배지를 50/50 농도로 배지에 첨가하였다.
- [0312] 3. 세포들을 14-28일 동안 매 3에서 4 일마다 재급식(refeeding)하면서 배양하였다.
- [0313] 4. 분화는 RT/PCR에 의해 인슐린 단백질 또는 인슐린 유전자 발현을 분석하여 규명하였다.
- [0314] 7. 심장 세포로 분화 유도
- [0315] 본 실시예는 코드 혈구들 및/또는 배아-유사 줄기 세포들의 심장 세포로 분화 유도를 설명한다.
- [0316] 다음 프로토콜은 근원성(myogenic) 분화를 야기하기 위하여 이용된다.

- [0317] 1. 태반 줄기 세포들은 레티노익 산(1 μ M), 염기성 섬유아세포 성장 인자(10 ng/ml) ; 및 트랜스포밍 성장 인자 베타-1(2 ng/ml) 및 상피 성장 인자(100ng/ml)으로 보충된 DMEM/20% CBS에서 배양하였다. 녀아웃 혈청 대체물은 CBS 대신에 사용될 수도 있다.
- [0318] 2. 대안적으로 태반 줄기 세포들을 24 시간동안 50ng/ml 카디오토로핀(Cardiotropin)-1로 보충된 DMEM/20 % CBS에서 배양한다.
- [0319] 3. 대안적으로 태반 줄기 세포들은 5에서 7 일동안 단백질 결핍된 배지에서 유지한 후 인간 심근 추출물(증가 용량 분석)로 자극한다.
- [0320] 심근 추출물은 1 % 코드 혈청으로 보충된 1 % HEPES 완충액에 1그램 인간 심근을 균질화하여 얻는다. 현탁액은 60 분동안 배양한 후 원심분리하고 상등액을 모은다.
- [0321] 4. 세포들은 10-14일 간 매 3에서 4 일마다 재급식하여 배양한다.
- [0322] 5. 분화는 심장 액틴 RT/PCR 유전자 발현 분석을 사용하여 측정하였다.
- [0323] 8. 분화 전 및/또는 후에 코드 혈구 및/또는 배아-유사 줄기세포들의 특성화
- [0324] 배아-유사 줄기 세포들, 코드 혈구 및/또는 배아-유사 줄기 세포들과 일군의 스파이크된 코드 혈구들은 분화 전 및/또는 후에 PCR과 같은 기술을 사용하여 유전자 발현의 변화를 측정하고 유동 세포 분석법 및 면역 세포 화학과 같은 기술을 사용하여 세포 표면 마커의 변화 및 형태학적 변화를 측정하여 특성화한다.
- [0325] 성장 인자들에 노출되었던 세포들 및/또는 분화된 세포들은 하기의 세포 표면 마커: CD10+, CD29+, CD34-, CD38-, CD44+, CD45-, CD54+, CD90+, SH2+, SH3+, SH4+, SSEA3-, SSEA4-, OCT-4+, 및 ABC-p+의 존재 및 부존재에 의하여 특성화된다.
- [0326] 바람직하게는 배아-유사 줄기 세포는 분화 전에 세포 표면 마커들인 OCT-4+, APC-p+, CD34- 및 CD38-의 존재에 의하여 특성이 나타내어진다. 이들 마커를 갖는 줄기 세포들은 인간 줄기 세포들 만큼 다용도(예를 들면, 만능)이다.
- [0327] 코드 혈구들은 분화 전에 CD34+와 CD38+의 존재에 의해 특성이 나타내어진다. 배아-유사 줄기 세포들로부터 유래한 분화된 세포들, 코드 혈액 세포 및/또는 일군의 줄기 세포들과 스파이크된 코드 혈구들은 바람직하게는 이들 마커들을 발현하지 않는다.
- [0328] -실시에 5-
- [0329] 배아-유사 줄기 세포로 근육 위축성 측삭 경화증을 갖는 환자의 치료
- [0330] 루게릭 병이라고도 불리는 근육 위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis;ALS)는 피질의 운동 뉴우런, 뇌간(brain stem) 및 척수에 영향을 주는 치명적인 퇴행성 신경질환이다. ALS는 매년 미국에서 5000건의 새로운 환자들을 갖는 2만명 정도의 미국인이 앓고 있다. ALS 환자의 대부분은 돌발적이나(S-ALS), 약 5-10%는 유전적이다(F-ALS). ALS는 자발적인 운동을 조절하는 뇌 및 척수의 특정한 신경 세포들이 점차적으로 퇴화할 때 ALS는 일어난다.
- [0331] ALS의 주요한 특징은 그들의 제어의 아래 있는 근육을 약화시키고 쇠약하게하여 마비에 이르게 하는 척수 운동 뉴우런들의 손실이다.
- [0332] ALS는 어떤 근육이 처음으로 약화되는냐에 따라 다양한 방법으로 나타난다.
- [0333] ALS는 중년에 여자보다 남자에게서 1과 1/2배 정도 더 잘 발병한다. ALS는 대체로 진단후에 5 년내에 치명적이다.
- [0334] ALS는 유전적 또는 돌발적 형태를 모두 갖고, 유전적 형태는 현재 몇 가지 독특한 유전적 위치와 연관되어 있다. 단지 약 5에서 10%의 ALS 환자들만이 유전적이다. 이들 중 15에서 20%는 구리/아연 수퍼옥사이드 디스무테이스1(SOD1)을 코딩하는 유전자의 돌연변이에 기인한다. 이들은 효소에 독성 성질을 부여하는 "기능획득(gain-of-function)" 돌연변이를 나타낸다.
- [0335] ALS의 원인으로 SOD 돌연변이의 발견은 그 질병의 이해에 있어서 일부 진보를 길을 열어 놓았다; 그 질병에 대한 동물 모델을 현재 이용할 수 있고 가설이 개발되어 있으며 세포 사멸을 이끄는 분자적인 일들에 관한 실험이 진행 중이다.

- [0336] 태반으로부터 유래한 배아-유사 줄기 세포들로 ALS를 가지고 있는 환자를 치료하는 방법에 대한 예를 아래에서 서술한다.
- [0337] 본 방법은 주변적이고(peripheral) 일시적인 엔지오키아테터(angiocatheter)를 통하여 정맥 내 주입을 포함한다.
- [0338] ALS를 가지고 있는 환자는 먼저 표준 실험실 분석들의 수행에 의하여 검사를 받는다. 그러한 분석들은 대사 프로파일; 차별적인(differential) CDC ; 지질 프로파일 ; 피브리노겐 레벨; ABO rH 혈액형 ; 간 기능 테스트들 ; 및 BUN/크레아틴 레벨의 결정을 포함한다. 환자들은 이식하기 전날 약물들(디페닐하이드라민(Benadryl™), 25 mg 하루 3회 및 프레드니손, 10 mg)을 투여하라고 지시받았다.
- [0339] 배아-유사 줄기 세포들은 단독 또는 코드 혈액과 스타이크된 형태이든 어느쪽이든지 냉동보존된 스탁으로부터 취해서 해동하고 이식전 약 이틀 동안 약 5°C에서 보존하였다.
- [0340] 환자들은 정맥 주입, 생리적인 모니터링 및 물리적인 관찰에 필요한 모든 장비가 구비된 외래환자 진단센터에 이주되었다. 이식 수술 대략 1 시간 전에, 환자들은 디페닐하이드라민(Benadryl™) 25 mg x 1 경구투여 및 프레드니손 10 mg x 1 경구 투여를 받았다. 이것은 예방적이고 급성 알러지 반응을 감소시킨다.
- [0341] 관류 시간에, 말초 정맥에 있는 18 G를 환자의 끝들 중 하나에 위치시키고, TKO 속도로 D5½ 노말 식염수+ 20mEq KCl mEqKCl의 주입에 의해 열려진채로 유지하였다.
- [0342] 환자들은 이식 전에 특히 심장 박동, 호흡 속도 및 체온을 조사하였다
- [0343] 심전도와 혈압 측정과 같은 다른 모니터링도 수행될 수 있다.
- [0344] 다음 배아-유사 줄기 세포들을 60 ml의 전체 운반되는 액체 부피 내에 시간당 1 단위의 속도로 주입하였다. 1 단위는 약 1-2 10⁹ 전체 유핵 세포이다.
- [0345] 대안적으로 그 단위의 배아-유사 줄기 세포들을 60 ml의 전체 액체 부피를 갖는 코드 혈액에 운반할 수 있다. 이 경우에 배아-유사 줄기 세포 대 코드 혈액의 줄기 세포들의 수의 비는 적어도 2 : 1이다.
- [0346] 투여된 단위는 또한 코드 혈액 만으로 이루어져 있을 수도 있다.
- [0347] 마우스들의 전임상 연구로부터의 자료에 의거하여서 체중 킬로그램 당 총 2.0 ~ 2.5 x 10⁸ 세포들이 투여된다. 예를 들어 70 킬로그램의 환자는 대략 14 ~ 18 x 10⁹ 총 유핵 세포들을 받을 것이다.
- [0348] 환자들은 즉시 주입 중단 신호들인 알러지 반응 또는 과민반응의 신호들을 모니터링 받아야 한다. 주입 후에, 환자들은 적어도 60 분동안 드러누운 자세로 모니터링되고 그 후 정상 활동을 재개할 수 있다.
- [0349] -실시에 6-
- [0350] 배아-유사 줄기 세포들을 이용하여 동맥경화증 환자 치료
- [0351] 실시예 5에서 나타난 주입 프로토콜은 배아-유사 줄기 세포 단독 이나 제대혈과 스파이크된 것을 동맥경화증 환자에게 투여하는데도 사용될 수 있다.
- [0352] 배아-유사 줄기 세포들 또는 보충된 세포 군들은 무증후성 환자들, 혈관 성형술에 대한 후보자들인 환자들 또는 최근(1주일 이내)에 심장 수술을 한 환자들에게 투여될 수 있다.
- [0353] 본 발명은 여기에 기재된 특정 실시예에 의하여 그 범위가 제한되지 않는다.
- [0354] 사실, 여기에 기재된 것 외에 본 발명의 여러 변형이 상술한 기재로부터 당업자에게 있어서 명백하게 될 것이다. 그러한 변형은 첨부된 청구범위의 범위 내에 해당된다.
- [0355] 각각의 개별 간행물 또는 특허 또는 특허출원이 명백하게 개별적으로 모든 목적들을 위해 인용에 의해 완전하게 합체되는 것과 마찬가지로, 본 명세서에서 인용된 모든 참고문헌들은 인용에 의해 동일한 정도로 모든 목적을 위해 완전히 합체된다.
- [0356] 어느 간행물의 인용은 본 특허의 출원일 이전에 그것이 발표된 것이고 본 발명이 선행 발명에 의한 그러한 간행물에 선행할 자격이 있지 않다고 인정하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

산업상 이용 가능성

[0357]

본 발명의 배아-유사 줄기 세포 및 배아-유사 줄기 세포와 줄기 세포의 혼합 군은 예를 들어, 하지만 이에 한정되지 않는, 이식을 위한 치료용도, 진단용도 및 연구용도와 같은 다양한 용도 및 적응증을 갖는다. 배아-유사 줄기 세포 및 혼합 군은 또한 예를 들어, 하지만 이에 한정되지 않는, 혈관질환, 신경질환 또는 장애, 자가면역 질환 또는 장애, 염증을 포함하는 질병 또는 이상 및 암 또는 이와 관련된 장애와 같은 질병 또는 이상의 치료에 유용하다.