



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0023194
(43) 공개일자 2017년03월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/12 (2015.01) A61K 31/721 (2006.01)
A61K 35/50 (2015.01) A61K 38/38 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/12 (2013.01)
A61K 31/721 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7004680(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년08월20일
심사청구일자 2017년02월20일
- (62) 원출원 특허 10-2011-7006317
원출원일자(국제) 2009년08월20일
심사청구일자 2014년08월19일
- (85) 번역문제출일자 2017년02월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/004740
- (87) 국제공개번호 WO 2010/021714
국제공개일자 2010년02월25일
- (30) 우선권주장
61/090,577 2008년08월20일 미국(US)

- (71) 출원인
안트로제네시스 코퍼레이션
미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
- (72) 발명자
제이틀린, 앤디
미국 07920 뉴저지주 바스킹 릿지 리버사이드 드라이브 29
루소티, 그레고리
미국 07980 뉴저지주 스틸링 셔우드 레인 74
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

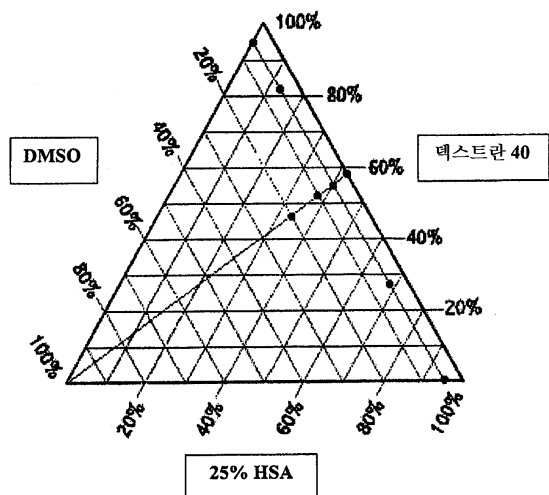
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 개선된 세포 조성물 및 그의 제조 방법

(57) 요약

태반 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제제화하는 개선된 방법, 및 그에 의해 제조된 개선된 조성물 및 세포 제제가 본원에 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/50 (2013.01)

A61K 38/38 (2013.01)

C12N 5/00 (2013.01)

(72) 발명자

허, 수양

미국 08836 뉴저지주 마틴스빌 톨로 로드 1100

팔, 아자이

미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 레반 코트 1

천, 홍, 제이.

미국 07059 뉴저지주 워렌 애플 트리 레인 8

브리에바, 토머스

미국 07726 뉴저지주 매닐라팰 컨트리 레인 14

쇼어, 라이언

미국 10950 뉴욕주 몬로 레이크 쇼어 드라이브 380

머피, 브라이언

미국 07302 뉴저지주 저지 시티 에이피티. 1 그린

스트리트 1/2 99

명세서

청구범위

청구항 1

(a) CD10⁺, CD34⁻ 및 CD105⁺인 단리된 인간 부착성 태반 세포를 텍스트란 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함하는 용액과 접촉시켜 세포-함유 용액을 형성하는 단계;

(b) 필터를 사용하여 상기 세포-함유 용액으로부터 거대 세포 덩어리를 여과하여 제거하는 단계;

(c) 상기 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우, 상기 세포를 텍스트란을 포함하는 희석 용액에 의해 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석하는 단계; 및

(d) 상기 세포를 동결보존시켜, 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포를 포함하는 조성물을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 희석 용액 중의 상기 텍스트란이 텍스트란 40인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 텍스트란 40이 5.0% w/v 텍스트란 40인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA가 10% w/v HSA인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 희석 용액이 HSA를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 HSA가 10% w/v HSA인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 희석 용액이 동결보호제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 동결보호제가 약 2.5% v/v 내지 약 10% v/v DMSO인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단계 (a)에서의 상기 용액이 동결보호제를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 인간 부착성 태반 세포를 포함하는 상기 조성물이 약 5.0% w/v 텍스트란, 약 10% w/v HSA 및 약 2.5% v/v 내지 약 10% v/v DMSO를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 세포를 포함하는 상기 조성물이 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/mL 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/mL를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 필터가 70 μm 필터인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 필터가 100 μm 필터인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$ 및 $\text{CD}105^+$ 인 단리된 인간 부착성 태반 세포가 $\text{CD}200^+$ 인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$ 및 $\text{CD}200^+$ 세포가 $\text{CD}45^-$ 또는 $\text{CD}90^+$ 인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$ 및 $\text{CD}200^+$ 세포가 $\text{CD}45^-$ 및 $\text{CD}90^+$ 인 방법.

청구항 17

제1항, 제4항, 제5항, 제6항 및 제10항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 조성물.

청구항 18

5% w/v 텍스트란 40, 10% w/v HSA 및 2.5% v/v 디메틸설폭사이드(DMSO)를 포함하는 용액 중에 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$ 및 $\text{CD}105^+$ 인 다수의 단리된 인간 부착성 태반 세포를 포함하고, 거대 세포 덩어리는 포함하지 않는 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 태반 줄기 세포가 동결보존된 세포를 해동시킨 것인 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 백 내에 함유된 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 10^6 개 세포당 약 200개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함하는 조성물.

청구항 22

제18항에 있어서, 10^6 개 세포당 약 150개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함하는 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 10^6 개 세포당 약 100개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함하는 조성물.

청구항 24

제18항에 있어서, 상기 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$ 및 $\text{CD}105^+$ 인 단리된 인간 부착성 태반 세포가 $\text{CD}200^+$ 인 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$ 및 $\text{CD}200^+$ 세포가 $\text{CD}45^-$ 또는 $\text{CD}90^+$ 인 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ 및 CD200⁺ 세포가 CD45⁻ 및 CD90⁺인 조성물.

청구항 27

제17항에 있어서, 제약 조성물인 조성물.

청구항 28

제18항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제약 조성물인 조성물.

청구항 29

제1항 또는 제11항에 있어서, 세포를 포함하는 조성물을 약 5 x 10⁶개 세포/mL 내지 1 x 10⁸개 세포/mL로 농축시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 세포를 포함하는 조성물이 대상체에게 피하 투여하기 위한 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2008년 8월 20일에 출원된 미국 가출원 제61/090,577호의 35 U.S.C. § 119(e) 하에서의 이점을 청구하고 있으며, 그 내용은 전체가 본원에 참고문헌으로 포함된다.

[0002] **1. 분야**

[0003] 세포, 예를 들어 줄기 세포 및 태반 세포, 예컨대 단리된 인간 부착성 태반 다능성 세포, 예를 들어 섹션 5.3에 기재된 태반 다능성 세포, 또는 태반 관류액으로부터 단리된 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터 단리된 전체 유핵 세포를 포함하는 개선된 조성물, 예를 들어 제약 조성물, 및 상기 조성물을 제조하는 개선된 방법이 본원에 제공된다.

배경 기술

[0004] **2. 배경기술**

[0005] 세포 조성물, 예를 들어 줄기 세포 조성물이 수많은 생리학적 결핍, 예를 들어 골수 대체에 대한 매력적인 요법이 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이러한 조성물을 개체에게 투여하기 위한, 세포, 예를 들어 줄기 세포의 개선된 제제가 요구된다.

과제의 해결 수단

[0007] **3. 개요**

[0008] 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포, 예컨대 태반 줄기 세포, 태반 다능성 세포, 적어도 두 가지 상이한 세포형, 예를 들어 골형성성 및 연골원성 세포형으로 분화되는 잠재력을 가진 확장가능한 태반 세포, 또는 태반 관류액으로부터 단리된 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터 단리된 전체 유핵 세포를 포함하는 조성물을 제조하는 개선된 방법, 및 이러한 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 개체에게 투여하기에 적합한 조성물이 본원에 제공된다. 개선된 방법은 세포의 동결보존 전 처리, 동결보존 및 해동을 위한 특정한 단계 및 특정한 조성물을 사용한다. 특정 실시양태에서, 개선된 방법은 동결보존된 세포의 해동후 덩어리 형성을 감소시키거나 제거한다. 바람직한 실시양태에서, 개선된 조성물은 태반 다능성 세포를 포함한다.

[0009] 한 실시양태에서, (a) 세포를 텍스트란 및 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함하는 용액과 접촉시켜 세포-함유 용액을 형성하는 단계; (b) 상기 세포-함유 용액을 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 형성하는 단계; (c) 임의로

상기 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하는 제1 회석 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 회석하는 단계; 및 (d) 임의로 상기 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하는 제2 회석 용액에 의해 회석하는 단계를 포함하는, 조성물을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 (b)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 15×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (c)에서 약 15×10^6 개 세포/mL로 회석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (c)는 (b)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (c)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL로 회석시킨다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 (b)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 7.5×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (c)에서 약 7.5×10^6 개 세포/mL로 회석시킨다. 구체적인 실시양태에서, 단계 (d)의 텍스트란을 포함하는 용액은 인간 혈청 알부민을 포함하지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 여과된 세포-함유 조성물의 세포는 단계 (d) 이전에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 이후에 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 이후 세포의 수가 약 7.5×10^6 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다.

[0010] 일부 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 용액 중의 상기 텍스트란은 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 텍스트란이다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 용액 중의 상기 텍스트란은 약 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 텍스트란이다. 제1 회석 용액 또는 제2 회석 용액 중의 텍스트란은 임의의 분자량을 갖는 텍스트란, 예를 들어 약 1 kDa 내지 약 150 kDa, 약 1 kDa 내지 약 125 kDa, 약 1 kDa 내지 약 100 kDa, 약 1 kDa 내지 약 75 kDa, 약 1 kDa 내지 약 50 kDa 또는 약 1 kDa 내지 약 25 kDa의 분자량을 갖는 텍스트란일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 회석 용액 또는 제2 회석 용액 중의 텍스트란은 약 1 kDa 내지 약 10 kDa, 약 30 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 60 kDa 내지 약 80 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 1이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 및 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 1이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 70이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 및 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 70이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 2.5% 내지 10% 텍스트란 40이다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 용액 중의 상기 텍스트란 40은 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 텍스트란 40이다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 용액 중의 상기 텍스트란은 약 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 텍스트란 40이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 5.0% 텍스트란 40이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 5.5% 텍스트란 40이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 10% 텍스트란 40이다.

[0011] 다른 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 폴리사카라이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 말토텍스트란 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 말토텍스트린), 트레할로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 트레할로스) 또는 헤타스타치 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%,

6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 헤타스타치)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 수크로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 수크로스), 헤파린 (예를 들어, 55 USP 유닛/ml 헤파린) 또는 글리코겐 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 글리코겐)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 말토텍스트란을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 트레할로스를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 헤타스타치를 포함한다.

[0012] 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 1 내지 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% 또는 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 4 내지 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 3.125% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 5% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 16.875% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 약 1 내지 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% 또는 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 약 4 내지 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 약 3.125% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 약 5% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 약 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석의 상기 HSA는 약 16.875% HSA이다.

[0013] 다른 실시양태에서, 상기 용액에서 HSA 뿐만 아니라 또는 대신에, 즉 대용으로 소 혈청 알부민 (BSA) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% BSA) 또는 태아 소 혈청 (FBS) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% FBS)을 사용할 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 제1 용액에서 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 6:1 HSA:텍스트란 내지 약 1:2.6 HSA:텍스트란이다. 일부 실시양태에서, HSA 대 텍스트란의 비율은 약 6:1, 5.5:1, 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2.0:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5, 1:2 또는 1:2.6 HSA:텍스트란이다. 일부 실시양태에서, 제1 용액에서 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 3.13% HSA/8.25% 텍스트란이다. 일부 실시양태에서, 제1 용액에서 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 16.88% HSA/2.75% 텍스트란이다. 특정 실시양태에서, 제1 용액에서 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 10% HSA/5.5% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70이다.

[0015] 또 다른 구체적 실시양태에서, 단계 (a)에서의 상기 용액 또는 세포-함유 용액은 동결보호제를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 동결보호제는 디메틸설폭사이드 (DMSO)이다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)에서 인용된 용액은 약 1% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10% 또는 약 10% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)에서 인용된 용액은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)에서 인용된 용액은 약 5% DMSO를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 추가로 동결보호제를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 동결보호제는 디메틸설폭사이드 (DMSO)이다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 추가로 약 1% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10% 또는 약 10% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 추가로 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 추가로

약 5% DMSO를 포함한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 약 5.5% 텍스트란 40, 약 10% HSA, 및 약 5% DMSO를 포함한다.

[0017] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 세포 및 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70을 포함하는 조성물을 생성한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 방법은 세포 및 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 40을 포함하는 조성물을 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 약 1.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 3.75×10^6 개 세포/mL를 포함하는 조성물을 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/mL 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/mL를 포함하는 조성물을 생성한다. 다른 구체적 실시양태에서, 방법은 약 1.0×10^6 개 세포/mL 내지 15×10^6 개 세포/mL, 예를 들어 약 7.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 15×10^6 개 세포/mL를 포함하는 조성물을 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 약 1% HSA 내지 약 15% HSA를 포함하는 조성물을 생성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 약 1% HSA 내지 약 10% HSA를 포함하는 조성물을 생성한다.

[0018] 추가로, (a) 70 μm - 150 μm 필터를 통해 5.5% 텍스트란 40 및 10% HSA를 포함하는 용액 중의 다수의 세포를 여과하여, 여과된 세포-함유 용액을 형성하는 단계; (b) 임의로 여과된 세포-함유 용액을 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 5% DMSO에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계; (c) 세포를 동결보존시키는 단계; (d) 세포를 해동시키는 단계; 및 (e) 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 희석하여, 상기 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 조성물을 제조하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 15×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행하며, 여기서 단계 (b)에서 약 15×10^6 개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 15×10^6 개 세포/mL 미만을 포함하는 경우, 여과는 임의적이다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우 수행하며, 여기서 단계 (b)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만을 포함하는 경우, 여과는 임의적이다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 7.5×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행하며, 여기서 단계 (b)에서 약 7.5×10^6 개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 7.5×10^6 개 세포/mL 미만을 포함하는 경우, 여과는 임의적이다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 여과된 세포-함유하는 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:5 (v/v)로 희석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11 (v/v)로 희석하는 것을 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 단계 (a)의 세포-함유 용액은 추가로 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 2% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)에서 인용된 용액은 추가로 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)에서 인용된 용액은 추가로 약 5% DMSO를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (a)에서의 필터는 70 μm 내지 100 μm 필터이다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, (a) 다수의 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (b) 5.5% 텍스트란 40 중에 세포를 재현탁시키는 단계; (c) 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (d) 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란 40 용액 중에 세포를 재현탁시켜, 세포-함유 용액을 생성하는 단계; (e) 40 μm 내지 150 μm 필터를 통해 세포-함유 용액을 여과하여, 여과된 세포-함유 용액을 생산하는 단계; (f) 임의로 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 5% DMSO 중의 여과된 세포-함유 용액을 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계; (g) 세포를 동결보존시키는 단계; (h) 세포를 해동시키는 단계; 및 (i) 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11 (v/v)로 희석하여, 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 상기 조성물을 제조하는 방법

이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 (e)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 15×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (f)에서 약 15×10^6 개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)는 (e)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (f)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL로 희석한다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 (e)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 7.5×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (f)에서 약 7.5×10^6 개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (d) 이후에 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 특정 실시양태에서, 단계 (d) 이후에 세포의 수가 약 7.5×10^6 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 특정 실시양태에서, 단계 (d)에서 인용된 재현탁이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만을 포함하는 세포-함유 용액을 생성하는 경우, 단계 (d)에서 인용된 용액은 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 2% 내지 약 15% DMSO를 포함하고, 단계 (f)는 수행하지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (e)에서의 필터는 70 μm 내지 100 μm 필터이다.

[0020] 또한, (a) 단리된 태반 세포, 5.5% 텍스트란 40 및 10% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함하는 용액을 가지성 세포 덩어리를 제거하는 필터에 의해 여과하여, 여과된 단리된 태반 세포-함유 용액을 생성하는 단계; (b) 임의로 여과된 단리된 태반 세포-함유 용액을 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 만들기에 충분한 양의 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 5% 디메틸설폭시드 (DMSO)를 포함하는 용액에 의해 여과된 단리된 태반 세포-함유 용액을 희석하는 단계; 및 (c) 상기 여과된 단리된 태반 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 희석하여, 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 상기 조성물을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 15×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우 수행되며, 여기서 단계 (b)에서 약 15×10^6 개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (b)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL로 희석한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 7.5×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (b)에서 약 7.5×10^6 개 세포/mL로 희석한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 상기 여과된 단리된 태반 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 약 1:1 내지 약 1:11 단리된 태반 세포-함유 용액:텍스트란 40 (v/v)의 비로 희석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 상기 여과된 단리된 태반 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 약 1:1 내지 약 1:5 단리된 태반 세포-함유 용액:텍스트란 40 (v/v)의 비로 희석하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 이후에 세포의 수가 약 7.5×10^6 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 구체적 실시양태에서, 상기 필터는 70 μm 필터이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 필터는 100 μm 필터이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단계 (a)의 필터는 70 μm 내지 100 μm 필터이다.

[0021] 상기 임의의 방법의 구체적 실시양태에서, 조성물은 제약 조성물이다.

[0022] 상기 임의의 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 생성된 세포 조성물을 약 5×10^6 개 세포/mL 내지 1×10^8 개 세포/mL로 농축시키는 것을 추가로 포함한다. 이와 같은 조성물은 예를 들어 그를 필요로 하는 개체에게 상기 조성물의 피하 투여에 유용하다.

[0023] 또 다른 측면에서, 세포, 예를 들어 줄기 세포, 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조된다. 한 실시양태에서, 다수의 세포, 예를 들어 줄기 세포, 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 용액이 본원에 제공되고, 여기서 상기 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/mL 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/mL를 포함하고, 상기 조성물은 임의의 가지성 세포 덩어리 (즉, 임의의 거대 세포 덩어리)를 포함하지 않거나 또는 그와 같은 가지성 덩

어리를 실질적으로 포함하지 않는다. 다른 특정 실시양태에서, 조성물은 약 1.0×10^6 개 세포/mL 내지 15×10^6 개 세포/mL, 예를 들어 약 7.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 15×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 다른 특정 실시양태에서, 조성물은 약 20×10^6 개 세포/mL 미만을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란 40을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 5.5% 텍스트란 40을 포함한다.

[0025] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 폴리사카라이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 비-글루코스 사카라이드 서브유닛을 포함하지 않는 글루코스의 중합체이다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 말토덱스트린 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 말토덱스트린), 트레할로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 트레할로스) 또는 헤타스타치 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 헤타스타치)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 수크로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 수크로스), 헤파린 (예를 들어, 55USP/ml 헤파린) 또는 글리코젠 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75% 또는 10% 글리코젠)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 말토덱스트린을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 대신에 트레할로스를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 대신에 헤타스타치를 포함한다.

[0026] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1% 내지 약 17% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% 또는 약 17% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 3.125% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 5% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 10% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 16.875% HSA를 포함한다.

[0027] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 HSA 뿐만 아니라 또는 대신에 소 혈청 알부민 (BSA) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% BSA) 또는 태아 소 혈청 (FBS) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% FBS)을 포함한다.

[0028] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 1% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1% 내지 약 5% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10% 또는 약 10% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% DMSO를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 약 5% DMSO를 포함한다.

[0029] 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 동결보존 및 해동되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 70 μ m 내지 100 μ m 필터에 의해 여과되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 가시성 세포 덩어리를 포함하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 200개 미만의 세포 덩어리를 포함하며, 여기서 상기 세포 덩어리는 현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 가시적이다. 또 다른 구체적 실

시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 150개 미만의 세포 덩어리를 포함하며, 여기서 상기 세포 덩어리가 현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 가시적이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 100개 미만의 세포 덩어리를 포함하며, 여기서 상기 세포 덩어리가 현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 가시적이다.

[0030] 본원에 기재된 임의의 방법 또는 조성물의 구체적 실시양태에서, 세포는 줄기 세포, 예를 들어 혈액이 배출된 산후 인간 태반으로부터 단리된 줄기 세포이다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 확장되었다. 임의의 상기 실시양태의 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 부착성 세포, 즉 조직 배양 표면, 예를 들어 조직 배양 플라스크 (예를 들어 코팅되지 않거나, 피브로넥틴, 라미닌 등으로 코팅됨)에 부착하는 세포이다. 부착성 세포의 예로는 예를 들어 본원에 기재된 부착성 태반 줄기 세포; 골수-유래 중간엽 줄기 세포, 섬유모세포 등이 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다.

[0031] 또 다른 실시양태에서, 상기 세포는 태반 관류액으로부터 수득된 (예를 들어, 단리된) 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 태반 관류액으로부터 수득된 유핵 세포, 예를 들어 전체 유핵 세포이다. 특정 실시양태에서, 관류에 의해 전체 유핵 태반 세포가 수득되는 태반은, 관류에 의해 전체 유핵 태반 세포를 수집하기 전에, 혈액이 배출되고, 잔류 혈액을 제거하도록 관류된다. 다른 특정 실시양태에서, 관류에 의해 전체 유핵 태반 세포가 수득되는 태반은, 관류에 의해 전체 유핵 태반 세포를 수집하기 전에, 혈액이 배출되지만, 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지는 않는다. 다른 특정 실시양태에서, 관류에 의해 전체 유핵 태반 세포가 수득되는 태반은, 관류에 의해 전체 유핵 태반 세포를 수집하기 전에, 혈액이 배출되지도 않고, 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지도 않는다.

[0032] 상기 방법의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 줄기 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 줄기 세포는 성인 줄기 세포, 체성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 체대 줄기 세포, 양수 줄기 세포, 골수-유래 중간엽 줄기 세포, 재대혈-유래 중간엽 줄기 세포, 말초혈-유래 중간엽 줄기 세포, 지방-유래 중간엽 줄기 세포 또는 골막-유래 중간엽 줄기 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포는 천연 킬러 세포이다.

[0033] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 단리된 태반 세포이다. 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 다른 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 다능성 세포이다.

[0034] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 다른 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 다능성 세포이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다능성 태반 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형을 갖는 세포, 골형성 표현형을 갖는 세포, 또는 연골원성 표현형을 갖는 세포로 분화하는 잠재력을 갖는다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD80^-$ 및 $CD86^-$ 이다.

[0035] 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 세포는 추가로 $CD29^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD54^+$, $CD80^-$, $CD86^-$, $SH3^+$ 또는 $SH4^+$ 중 하나 이상이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD44^+$ 이다. 상기 임의의 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포의 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 $CD117^-$, $CD133^-$, KDR^- ($VEGFR2^-$), $HLA-A,B,C^+$, $HLA-DP,DQ,DR^-$ 및/또는 프로그래밍된 사멸-1 리간드 ($PDL1^+$) 중 하나 이상이다.

[0036] 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD200⁺ 및 HLA-G⁺; CD73⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺; CD200⁺ 및 OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺; CD73⁺ 및 CD105⁺이며, 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양될 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 OCT-4⁺이며, 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양될 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 이들의 임의의 조합이다. 구체적 실시양태에서, 상기 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD73⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD73⁺ 및 CD105⁺ 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다.

[0037] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, CD117⁻, CD133⁻, CD200⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, MHC-I⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A, B, C⁺, HLA-DP, DQ, DR⁻, PDL1⁺ 또는 ABC-p⁺ 중 하나 이상이고, 여기서 ABC-p는 태반-특이적 ABC 트랜스포터 단백질인 (유방암 내성 단백질 (BCRP) 및 미톡산트론 내성 단백질 (MXR)로도 공지됨)이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺ 및 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-1⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 ABC-p⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이다. 구체적 실시양태에서, 상기 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻ 세포는 추가로 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺ 및 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻이고, SH3⁺ 또는 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁻, 및 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺ 또는 OCT-4⁺이다. 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ 및 CD200⁺이다.

[0038] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 치료 방법에 유용한 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁻, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, β2-마이크로글로불린^{low}, MHC-I^{low}, MHC-II⁻, HLA-G^{low}, 및/또는 PDL1^{low} 중 하나 이상이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD29⁻ 및 CD54⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD44⁺ 및 CD106⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD29⁺이다.

[0039] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 동등한 수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준에서 하나 이상의 유전자를 발현하며, 여기서 상기 하나 이상 유전자는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A 중 하나 이상이고, 상기 골수-유래 중간엽 줄기 세포에서는 상기 단리된 세포에 진행된 계대 횟수와 동등한 횟수로 계대 배양된다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 60% 돌베코 변경된

이글의 배지 (DMEM)-LG (바람직하게는 킵코(Gibco) 제품) 및 40% MCDB-201 (바람직하게는 시그마(Sigma) 제품); 2% 소 태아 혈청 (바람직하게는 하이클론 랩스.(Hyclone Labs.) 제품); 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1x 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10^{-9} M 텍사메타손 (바람직하게는 시그마 제품); 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (바람직하게는 시그마 제품); 표피 성장 인자 10 ng/mL (바람직하게는 알앤디 시스템즈(R&D Systems) 제품); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/mL (바람직하게는 알앤디 시스템즈 제품)를 포함하는 배지에서 약 3 내지 약 35 개체수 배가 동안 배양할 때 하나 이상의 상기 유전자를 발현한다. 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 60% DMEM-LG (바람직하게는 킵코 제품) 및 40% MCDB-201 (바람직하게는 시그마 제품); 2% 소 태아 혈청 (바람직하게는 하이클론 랩스. 제품); 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1x 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10^{-9} M 텍사메타손 (바람직하게는 시그마 제품); 10^{-4} M 아스코르브산 2-포스페이트 (바람직하게는 시그마 제품); 표피 성장 인자 10 ng/mL (바람직하게는 알앤디 시스템즈 제품); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/mL (바람직하게는 알앤디 시스템즈 제품)를 포함하는 배지에서 약 3 내지 약 35 개체수 배가 동안 배양할 때 하나 이상의 상기 유전자를 발현한다.

[0040] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 줄기 세포는 신경영양 성장 인자 신경교 세포-유래 신경영양 인자 (GDNF), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 간세포 성장 인자 (HGF), 태반 성장 인자 (PGF) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 발현한다.

[0041] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 세포의 적어도 50%가 상기 단리된 태반 세포인 세포의 집단 내에 함유된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 세포의 적어도 70%가 상기 단리된 태반 세포인 세포의 집단 내에 함유된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 세포의 적어도 80%가 상기 단리된 태반 세포인 세포의 집단 내에 함유된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 세포의 적어도 90%가 상기 단리된 태반 세포인 세포의 집단 내에 함유된다. 다른 특정 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중의 태반 세포는 모체 유전자형을 갖는 세포를 실질적으로 함유하지 않으며, 예를 들어 상기 집단 중 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 태반 세포가 태아 유전자형을 가지며, 즉 태아 기원이다. 다른 특정 실시양태에서, 상기 태반 세포를 포함하는 세포의 집단은 모체 유전자형을 갖는 세포를 실질적으로 함유하지 않으며, 예를 들어 상기 집단 중 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 세포가 태아 유전자형을 가지며, 즉 태아 기원이다.

[0042] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁺ 태반 세포, 예를 들어 조혈 태반 세포이다. 이러한 세포는 태반 조직으로부터, 예를 들어 체대혈이 제거되었고, 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 태반으로부터 수득가능하다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 태반 세포는 CD38⁺이다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 태반 세포는 CD38⁻이다. 다른 특정 실시양태에서, CD34⁺ 태반 세포는 CD45⁺이다. 구체적인 실시양태에서, 태반 세포는 CD34⁺, CD38⁻ 및 CD45⁺이다.

[0043] 단리된 태반 세포의 임의의 상기 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 일반적으로 성장 배지, 즉, 증식을 촉진시키도록 제제화된 배지에서 배양하는 동안, 예를 들어 성장 배지에서 증식하는 동안 분화되지 않는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 증식을 위해 피더 층(feeder layer)을 필요로 하지 않는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포를 피더 층의 부재하에 배양한 결과, 이는 배양물 중에서 분화되지 않는다.

[0044] 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 혈액이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 산후 태반, 혈액이 배출되었지만 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지 않은 산후 태반, 또는 혈액이 배출되지 않고 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지도 않은 산후 태반을 관류시킴으로써 수득된다. 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태반 조직의 물리적 및/또는 효소에 의한 파괴에 의해 수득된다.

[0045] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 태반 세포 은행의 구성의 일부로서 여과 및 동결보존된다. 예를 들어, 단리된 태반 세포는 태반, 또는 태반 조직으로부터 단리되고, 배양 후에 예를 들어 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 40, 예를 들어 5.5% 텍스트란 40을 포함하는 용액 중에 재현탁된다. 보다 구체적인 실시양태에서, 상기 용액은 동결보존을 위한 제제에서 추가로 HSA 및/또는 DMSO를 포함한다. 상기 은행 중 동결보존된 단리된 태반 세포는 필요에 따라 해동되고, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이 10% 텍스트란 40을 포함하는 용액으로 희석된다. 상기 방법의 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 여과 및 희석 방법은 단리된 태반

세포의 초기 단리의 일부가 아니다.

[0046] 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 혈액이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 산후 태반의 관류에 의해 획득된다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태반 조직의 물리적 및/또는 효소에 의한 파괴에 의해 획득된다.

발명의 효과

[0047] **

도면의 간단한 설명

[0048] **4. 도면의 간단한 설명**

도 1은 HSA, 텍스트란 40 및 DMSO의 용액 공간, 및 세포 생존율 및 증식에 대한 다양한 성분 농도의 효과를 평가하기 위한 실험 고안을 도시하는 삼원 다이어그램을 나타낸다.

도 2는 상이한 백분율의 DMSO를 포함하는 제제에 대한 필터 체류 검정 (FRA) 데이터를 나타낸다. 데이터는 바이-셀(Vi-Cell) 세포 생존율 분석기 상에서 관독한 것으로서 부하된 10^6 개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다. 검정 대조군 = 100% 텍스트란 40 용액, 세포 염색함, 세포 없음.

도 3은 상이한 부피 분율의 HSA를 포함하는 세포 제제에 대한 FRA 데이터를 나타낸다. 데이터는 바이-셀 세포 생존율 분석기 상에서 관독한 것으로서 부하된 10^6 개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다. 검정 대조군 = 100% 텍스트란 40 용액, 세포 염색함, 세포 없음.

도 4는 상이한 백분율의 DMSO (0-20%)를 포함하는 세포 제제에 대한 해동후 트리판 블루 생존율을 나타낸다.

도 5는 다양한 농도의 DMSO (0-20%)의 함수로서의 해동후 전체 세포 회수율을 나타낸다.

도 6은 MTS 검정 (하기 섹션 6.3.1 참조)에 의해 평가되는, 상이한 백분율의 DMSO를 포함하는 다양한 제제의 함수로서의 배양물 복구를 나타낸다.

도 7은 상이한 부피 분율의 25% HSA를 포함하는 세포 제제에 대한 해동후 세포 생존율을 나타낸다.

도 8은 HSA 부피 분율의 함수로서의 해동후 전체 세포 회수율을 나타낸다.

도 9는 셀 타이터 96(Cell Titer 96®) 수성 비-방사성 세포 증식 검정 (프로메가(Promega), 위스컨신주 매디슨)의 사용에 의해 생성되는, 상이한 분율의 HSA의 함수로서의 배양물 복구를 평가하는 데이터를 나타낸다.

도 10은 상이한 농도의 제제 성분을 포함하는 제제에 대한 비드(Bead) 반응 검정에 의해 평가되는 면역억제의 수준을 나타낸다.

도 11은 FRA 검정에 의해 측정되는, 다양한 동결 세포 밀도 ($1-40 \times 10^6$ 개 세포/mL)의 함수로서의 세포 응집을 나타낸다. 데이터는 바이-셀 세포 생존율 분석기 상에서 관독한 것으로서 부하된 10^6 개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다.

도 12는 동결 세포 밀도 ($1-40 \times 10^6$ 개 세포/mL)의 함수로서의 세포 응집을 나타낸다. 데이터는 바이-셀 세포 생존율 분석기 상에서 관독한 것으로서 부하된 10^6 개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다.

도 13은 FRA 검정에 의해 측정되는, 다양한 분자량의 텍스트란의 함수로서의 세포 응집을 나타낸다. FRA 신호는 텍스트란 1,000, 40,000 및 70,000 (즉, 각각 텍스트란 1, 텍스트란 40 및 텍스트란 70)에 대한 것이다. 데이터는 부하된 10^6 개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다. 검정 대조군 = 100% 텍스트란 40 용액, 세포 염색함, 세포 없음.

도 14는 상이한 분자량의 텍스트란을 포함하는 제제에 대한 해동후 생존율을 나타낸다.

도 15는 상이한 분자량의 텍스트란을 포함하는 제제에 대한 세포 회수율을 나타낸다.

- 도 16은 상이한 분자량의 텍스트란을 포함하는 제제에 대한 CD105⁺/CD200⁺을 나타낸다.
- 도 17은 상이한 분자량의 텍스트란을 포함하는 제제에 대한 비드 T 세포 반응 (BTR) 데이터를 나타낸다.
- 도 18은 상이한 폴리사카라이드를 포함하는 제제에 대한 FRA에 의해 측정된 세포 응집을 나타낸다. 검정 대조군 = 100% 텍스트란 40 용액, 세포 염색함, 세포 없음.
- 도 19는 비-텍스트란 40 폴리사카라이드로 제제화된 세포의 해동후 생존율을 나타낸다. 데이터는 부하된 10⁶개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다.
- 도 20은 상이한 폴리사카라이드를 포함하는 제제의 함수로서의 생존 세포 회수율을 나타낸다.
- 도 21은 텍스트란 40을 포함하거나, 텍스트란 40 대신에 말토텍스트란, 수크로스, 트레할로스, 헤파린, 헥사타치 또는 글리코젠을 포함하는 세포 제제에서 CD105⁺/CD200⁺ 발현을 나타낸다.
- 도 22는 텍스트란 40 및 6가지 비-텍스트란 40 상이한 당/폴리사카라이드에 대한 BTR 데이터를 나타낸다.
- 도 23은 10% 인간 혈청 알부민 (HSA), 10% 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 10% 태아 소 혈청 (FBS)을 포함하는 제제에 대한 FRA에 의해 측정된 세포 응집을 나타낸다. 검정 대조군 = 100% 텍스트란 40 용액, 세포 염색함, 세포 없음.
- 도 24는 10% HSA, 10% BSA 또는 10% FBS를 포함하는 제제에 대한 세포 해동후 생존율을 나타낸다.
- 도 25는 10% HSA, 4% HSA, 10% BSA 또는 10% FBS를 포함하는 제제에 대한 해동후 회수율을 나타낸다.
- 도 26은 10% HSA, 4% HSA, 10% BSA 또는 10% FBS를 포함하는 제제에 대한 CD105⁺/CD200⁺ 발현에 의해 측정된 세포 동일성을 나타낸다.
- 도 27은 10% HSA, 10% BSA 또는 10% FBS를 포함하는 제제에 대한 CD34⁻/CD10⁺ 발현을 나타낸다.
- 도 28은 10% HSA, 4% HSA, 10% BSA 또는 10% FBS를 포함하는 제제에 대한 BTR 검정에 의해 측정된 세포 기능성을 나타낸다.
- 도 29는 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BMMSC) 세포 및 천연 킬러 (NK) 세포에 대한 FRA 세포 응집 결과를 나타낸다. 데이터는 부하된 10⁶개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 5. 상세한 설명
- [0050] 5.1 정의
- [0051] 본원에 사용된 용어 "약"은 예를 들어 언급된 수 또는 값의 10% 이내를 의미한다.
- [0052] 본원에 사용된 "거대 세포 덩어리"는 확대하지 않고도 보이는, 예를 들어 육안으로 보이는 세포 응집체를 의미하며, 일반적으로 약 150 μm보다 큰 세포 응집체를 나타낸다.
- [0053] 본원에 사용된 "미세 세포 덩어리"는 확대해야지만 보이는 세포 응집체를 의미하며, 일반적으로 약 150 μm보다 작은 세포 응집체를 나타낸다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "SH2"는 마커 CD105 상의 에피토프에 결합하는 항체를 나타낸다. 따라서, SH2⁺로 지칭되는 세포는 CD105⁺이다.
- [0055] 본원에 사용된 용어 "SH3" 및 SH4"는 마커 CD73 상의 에피토프에 결합하는 항체를 나타낸다. 따라서, SH3⁺ 및/또는 SH4⁺로 지칭되는 세포는 CD73⁺이다.
- [0056] 본원에 사용된 용어 "단리된 세포", 예를 들어 "단리된 줄기 세포"는 세포가 유래되는 조직, 예를 들어 태반의 다른 세포로부터 실질적으로 분리된 세포를 의미한다. 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%의 천연적으로 관련된 세포가 예를 들어 세포의 수집 및/또는 배양 동안에 상기 세포로부터 제거되는 경

우, 세포는 "단리된" 것이다.

- [0057] 본원에 사용된 "다능성"은 세포에 대해 지칭되는 경우, 이는 세포가 반드시 모든 유형은 아니지만 일부 유형의 신체 세포로 분화되거나, 모든 유형은 아니지만 일부 유형의 신체 세포의 특징을 가진 세포로 분화될 수 있는 능력을 가진 세포를 의미한다. 특정 실시양태에서, 예를 들어 연골원성 또는 골형성 세포의 특징을 가진 세포로 분화되는 능력을 가진 단리된 다능성 세포는 다능성 세포이다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "단리된 세포의 집단"은 세포의 집단이 유래되는 조직, 예를 들어 태반의 다른 세포로부터 실질적으로 분리된 세포의 집단을 의미한다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "태반 줄기 세포"는 형태학, 세포 표면 마커, 또는 일차 배양 이후 계대의 수와는 무관하게, 포유동물 태반으로부터 유래된 줄기 세포 또는 전구 세포를 나타낸다. 태반 줄기 세포는 혈액, 예를 들어 체대혈 또는 태반 혈액으로부터 수득되지 않거나 수득될 수 없다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "태반 줄기 세포" 및 "태반 다능성 세포"는 영양막세포, 혈관모세포, 혈액모세포, 배아 생식 세포, 배아 줄기 세포, 또는 배반포의 내부 세포 물질로부터 수득되는 세포, 배아 생식선 용기로부터 수득되는 세포, 예를 들어 배아 생식 세포를 나타내지 않으며, 태반 줄기 세포 및 태반 다능성 세포는 이들이 아니다. 세포가 줄기 세포의 속성, 예를 들어 하나 이상의 유형의 줄기 세포와 관련된 마커 또는 유전자 발현 프로파일; 배양물에서 적어도 10-40배 복제하는 능력, 세 배엽 중 하나 이상의 세포로 분화하는 능력; 성인 (즉, 분화된) 세포 특징의 결여 등을 나타내는 경우, 세포는 "줄기 세포"로 고려된다. 용어 "태반 줄기 세포" 및 "태반-유래 줄기 세포"는 상호교환적으로 사용될 수 있다. 본원에서 달리 언급하지 않는 한, 용어 "태반"은 제대를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 태반 줄기 세포는 시험관 내에서 분화되거나 (분화 조건 하에), 생체 내에서 분화되거나, 또는 이들 둘 다에서 분화된다.
- [0060] 본원에서 사용된 세포, 예를 들어 줄기 세포는 마커가 배경값을 초과하여 검출가능한 경우 이러한 특정 마커에 대해 "양성"이다. 예를 들면, 태반 세포는 예를 들어 CD73에 대해 양성인데, 이는 CD73이 배경값보다 (예를 들어, 이소형 대조군과 비교하여) 검출가능하게 큰 양으로 태반 줄기 세포 상에서 검출가능하기 때문이다. 마커가 세포를 하나 이상의 또 다른 세포 유형으로부터 구별하는데 사용될 수 있거나 또는 세포에 의해 발현되거나 존재하는 경우 세포를 선별 또는 단리하는데 사용될 수 있는 경우, 세포는 이러한 마커에 대해 또한 양성이다. 예를 들어, 항체-매개 검출의 상황에서, 특정 세포 표면 마커가 존재한다는 표시로서의 "양성"은 이러한 마커에 대해 특이적인 항체, 예를 들어, 형광-표지 항체로 이러한 마커가 검출가능하다는 것을 의미한다; "양성"은, 예를 들어, 세포측정기에서, 배경값을 검출가능하게 초과하는 신호를 일으키는 양으로 마커를 나타내는 세포를 또한 지칭한다. 예를 들어, 세포가 CD200에 대해 특이적인 항체로 검출가능하게 표지되고, 항체로부터의 신호가 대조군 (예를 들어, 배경값 또는 이소형 대조군)의 신호보다 검출가능하게 높은 경우 세포는 "CD200⁺"이다. 반대로, 동일한 상황에서의 "음성"은 세포 표면 마커가 배경값과 비교하여 이러한 마커에 대해 특이적인 항체를 사용하여 검출가능하지 않은 것을 의미한다. 예를 들어, 세포가 배경값보다 큰 정도로 CD34에 대해 특이적인 항체로 재현가능하게 검출가능하게 표지되지 않는 경우 세포는 "CD34⁻"이다. 항체를 사용하여 검출되지 않거나 검출가능하지 않은 마커는 적합한 대조군을 사용하여 유사한 방식으로 양성 또는 음성인 것으로 결정된다. 예를 들면, RT-PCR, 슬롯 블롯(slot blot) 등과 같은 RNA 검출 방법에 의해 결정시, 세포 또는 세포의 집단으로부터의 RNA에서 검출된 OCT-4 RNA의 양이 배경값보다 검출가능하게 크면 세포 또는 세포의 집단이 OCT-4⁺인 것으로 결정될 수 있다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체를 사용하여 분화 클러스터 ("CD") 마커가 검출된다. OCT-4 RNA가 RT-PCR을 이용하여 검출가능한 경우, OCT-4는 존재하는 것으로 결정될 수 있고, 세포는 "OCT-4⁺"이다.
- [0061] **5.2 세포를 포함하는 개선된 조성물, 및 상기 조성물의 제조 방법**
- [0062] 세포, 예를 들어 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제조하는 개선된 방법, 및 그에 의해 생성되는 개선된 조성물, 예를 들어 제약 조성물이 본원에 제공된다. 일반적으로 조성물, 예를 들어 세포를 포함하는 액체 형태로 투여가능한 조성물은 예를 들어 세포 덩어리, 특히 육안으로 보이는 세포 덩어리 (즉, 거대 덩어리)가 개체에게 제약 조성물을 투여하기 전에 제거되는 경우 수용자에게 더운 관용성이다. 본원에 기재된 바와 같이 세포, 예를 들어 줄기 세포, 예컨대 혈액이 배출된 인간 산후 태반의 줄기 세포, 태반 세포를 포함하는 조성물의 제조 방법에 의해, 개체에게 투여시 실질적으로 더욱 관용성인 조성물이 생성된다.
- [0063] 한 실시양태에서, 세포를 포함하는 용액을 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 생성하는 단계; 여과된 세포-함유

용액을 예를 들어 동결보존시키기 전에 제1 회석 용액에 의해 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 회석하는 단계; 임의로 생성된 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하는 제2 회석 용액에 의해 회석하여, 상기 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조 방법이 본원에 기재된다. 또 다른 실시양태에서, 세포를 포함하는 용액을 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 생성하는 단계; 여과된 세포-함유 용액을 예를 들어 동결보존시키기 전에 제1 회석 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL 이하로 회석하는 단계; 및 임의로 생성된 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하는 제2 회석 용액에 의해 회석하여, 상기 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다.

[0064] 구체적 실시양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 줄기 세포는 골수-유래 중간엽 줄기 세포, 또는 성인 줄기 세포이다. 구체적 실시양태에서, 세포는 단리된 태반 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 태반 관류액으로부터의 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 유핵 세포이다. 태반 관류액 세포를 수득하는 방법은 하기 섹션 5.3.4에 기재되어 있다.

[0065] 구체적 실시양태에서, 세포는 제1 회석 용액에 의한 상기 회석과 상기 제2 회석 용액에 의한 상기 회석 사이에 동결보존된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제1 회석 용액은 텍스트란 및 HSA를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 텍스트란이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 1이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 및 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 1이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 70이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 및 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 70이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 및 상기 제2 회석 용액 중의 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 약 2.5% 텍스트란 40 내지 약 10% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 약 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 또는 10% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 약 5.5% 텍스트란 40이다.

[0066] 다른 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 폴리사카라이드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 글루코스의 중합체 (2 이상의 서브유닛)이며, 글루코스가 아닌 사카라이드 서브유닛을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 회석 용액은 하나 이상의 말토텍스트린 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 말토텍스트린), 트레할로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 트레할로스), 또는 헤타스타치 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 헤타스타치)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 회석 용액은 하나 이상의 수크로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 수크로스), 헤파린 (예를 들어, 약 55 USP 유닛/ml 헤파린), 또는 글리코젠 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 글리코젠)

을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 희석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 말토덱스트란을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 희석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 트레할로스를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 및/또는 제2 희석 용액은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 헤타스타치를 포함한다.

[0067] 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 1 내지 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% 또는 약 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 4 내지 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 3.125% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 5% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 16.875% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 HSA를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 1 내지 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% 또는 17% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 4 내지 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 3.125% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 5% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 약 16.875% HSA이다.

[0068] 다른 실시양태에서, 상기 용액 중에서 HSA 뿐만 아니라 또는 대신에, 즉 대용으로 소 혈청 알부민 (BSA) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% BSA) 또는 태아 소 혈청 (FBS) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% FBS)을 사용할 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 제1 용액 중의 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 6:1 HSA:텍스트란 내지 약 1:2.6 HSA:텍스트란이다. 일부 실시양태에서, HSA 대 텍스트란의 비는 약 6:1, 5.5:1, 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2.0:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5, 1:2 또는 1:2.6 HSA:텍스트란이다. 일부 실시양태에서, 제1 용액 중의 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 3.13% HSA/8.25% 텍스트란이다. 일부 실시양태에서, 제1 용액 중의 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 16.88% HSA/2.75% 텍스트란이다. 특히 실시양태, 제1 용액 중의 HSA 대 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70의 비는 약 10% HSA/5.5% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70이다.

[0070] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 추가로 동결보호제를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 동결보호제는 디메틸술폰(DMSO)이다. 특정한 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 추가로 약 1% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10% 또는 약 10% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 추가로 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% DMSO를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 추가로 약 5% DMSO를 포함한다.

[0071] 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 약 5.5% 텍스트란 40, 약 10% HSA, 및 약 5% DMSO를 포함한다.

[0072] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제2 희석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 약 10% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 조성물은 약 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 또는 10% 텍스트란을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 조성물은 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 5.0×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/mL 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/mL를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 제2 희석 용액은 HSA를 포함하지 않는다.

[0073] 본원에 제공된 방법에서 사용가능한 텍스트란은 약 1 kDa 내지 약 150 kDa, 예를 들어 1 kDa (텍스트란 1), 약 40 kDa (텍스트란 40) 또는 약 70 kDa (텍스트란 70)의 분자량을 갖는 텍스트란이다.

[0074] 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 용액은 동결보호제를 포함한다. 세포를 포함하는 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만을 포함하는 경우, 제1 회석 단계는 생략될 수 있고, 특정 실시양태에서, 세포가 현탁되는 용액은 동결보존제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 2% 내지 약 15% DMSO, 예를 들어 약 5% DMSO를 포함할 수 있다.

[0075] 또 다른 실시양태에서, (a) 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포, 또는 태반 관류액으로부터 단리된 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터 단리된 전체 유헤 세포, 텍스트란 및 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함하는 용액을 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 생성하는 단계; (b) 임의로 상기 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하는 제1 회석 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 회석하는 단계; 및 (c) 임의로 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하지만 HSA는 포함하지 않는 제2 회석 용액으로 회석하여, 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 조성물의 제조 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 15×10^6 개 세포/mL를 초과하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (b)에서 약 15×10^6 개 세포/mL로 회석한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (b)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL로 회석한다. 상기 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만을 포함하는 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 회석은 생략되고, 단계 (a) 중의 용액은 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 2% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (a)에서 여과된 세포-함유 용액이 약 7.5×10^6 개 세포/mL 초과를 포함하는 경우에 수행되며, 여기서 단계 (b)에서 약 7.5×10^6 개 세포/mL로 회석한다. 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 단계 (c) 이전에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 단계 (c) 이전에 동결보존된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 또는 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 및 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 5.0% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 5.5% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 약 1% HSA 내지 약 15% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 HSA를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 5% HSA이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액 중의 상기 HSA는 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 회석 용액은 추가로 동결보호제를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 동결보호제는 DMSO, 예를 들어 약 2% 내지 약 15% DMSO이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제2 회석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 10% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단계 (a)에서의 상기 용액은 동결보호제를 포함한다.

[0076] 상기 방법의 한 측면에서, 세포를 포함하는 최종 생성물 중의 세포 덩어리의 수를 바람직하게는 동결보존 이전에 여과를 이용하여 감소시키거나 제거한다. 세포-함유 용액 중의 세포가 동결보존되는 특정 실시양태에서, 세포-함유 용액은 동결보존 이전에 여과된다. 예를 들어, 용액 중의 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 동결보존 이전에 필터에 통과시켜 가시성 세포 덩어리 (세포 응집체, 즉 거대 세포 덩어리)를 제거할 수 있다. 한 실시양태에서, 여과는 상기 세포를 동결보존시키기 전에 세포-함유 용액을 필터를 통해 여과시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 필터는 약 50 μm 내지 약 150 μm 직경의 공극을 포함하고 (즉, 필터는 약 50 μm 필터 내지 약 150 μm 필터임), 상기 필터는 세포를 포함하는 용액을 여과하는데 적합하다. 예를 들어, 상기 필터는 약 50 내지 약 80 μm , 약 60 μm 내지 약 90 μm , 약 70 μm 내지 약 100 μm , 약 80 μm 내지 약 110 μm , 약 90 μm 내지 약 120 μm , 약 100 μm 내지 약 130 μm , 약 110 μm 내지 약 140 μm , 또는 약 120 μm 내지 약 150 μm 의 공극을 포함하는 필터일 수 있거나, 또는 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 또는 150 μm 필터일 수 있다. 구체적 실시양태에서, 상기 필터는 70 μm 필터이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 필터는 100 μm 필터이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 필터는 약 70 μm 필터 내지 100 μm 필터이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포-함유 용액을 동결시키기 전에 여과할 뿐만 아니라 해동후에도 여과한다.

- [0077] 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다.
- [0078] 다양한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포를 포함하는 조성물의 제조 방법은 세포를 약 50×10^6 , 40×10^6 , 30×10^6 , 20×10^6 , 15×10^6 , 10×10^6 , 9.5×10^6 , 9×10^6 , 8.5×10^6 , 8×10^6 , 7.5×10^6 , 7×10^6 , 6.5×10^6 , 6×10^6 , 5.5×10^6 , 5×10^6 , 4.5×10^6 , 4×10^6 , 3.5×10^6 , 3×10^6 , 또는 2.5×10^6 개 세포/mL 이하에서 동결보존시키는 것을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 세포를 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 약 15×10^6 개 세포/mL 이하에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 약 5×10^6 개 세포/mL 이하에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 약 5.0×10^6 내지 약 7.5×10^6 개 세포/mL에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 약 5×10^6 개 세포/mL에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 약 7.5×10^6 개 세포/mL 이하에서 동결보존시킨다. 구체적 실시양태에서, 세포를 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포를 해동시키고 1:1 내지 1:11 (v/v), 예를 들어 1:1 내지 1:5 (v/v)로 텍스트란 40, 예를 들어 10% 텍스트란 40에 의해 희석하였을 때, 10^6 개 세포당 2개 이하의 가시성 세포 덩어리 (즉, 거대 세포 덩어리)가 형성되는 수에서 상기 세포를 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포를 해동시키고, 1:1 내지 1:11 (v/v), 예를 들어 1:1 내지 1:5 (v/v)로 텍스트란 40, 예를 들어 10% 텍스트란 40에 의해 희석하였을 때, 상기 세포가 가시성 세포 덩어리를 형성하지 않는 수에서 동결보존시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포를 해동시키고, 1:1 내지 1:11 (v/v), 예를 들어 1:1 내지 1:5 (v/v)로 10% 텍스트란 40에 의해 희석하였을 때, 상기 세포가 10^6 개 세포당 약 150, 140, 130, 120, 110 또는 100개 미만의 미세 세포 덩어리를 형성하는 수에서 상기 세포를 동결보존시킨다.
- [0079] 또 다른 실시양태에서, 예를 들어 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포를 동결보존시킨 후에 텍스트란 40을 포함하는 용액과 접촉시키는, 예를 들어 세포를 텍스트란 40을 포함하는 용액에 재현탁시키거나 그로 희석시키는 것을 포함하는, 조성물의 제조 방법이 본원에 제공된다. 구체적 실시양태에서, 용액은 약 2.5% 텍스트란 40 내지 약 10% 텍스트란 40 (w/v)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 용액은 약 5% 텍스트란 40 내지 약 10% 텍스트란 40 (w/v)을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 용액은 5.0% 텍스트란 용액 또는 10% 텍스트란 용액이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 용액은 5.5% 텍스트란 용액 또는 10% 텍스트란 용액이다. 다른 실시양태에서, 텍스트란은 약 1 킬로달톤 내지 약 150 킬로달톤의 분자량, 예를 들어 평균 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 텍스트란은 약 1 kDa 내지 약 150 kDa, 약 1 kDa 내지 약 125 kDa, 약 1 kDa 내지 약 100 kDa, 약 1 kDa 내지 약 75 kDa, 약 1 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 1 kDa 내지 약 25 kDa의 분자량, 예를 들어 평균 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 텍스트란은 약 1 kDa 내지 약 10 kDa, 약 30 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 60 kDa 내지 약 80 kDa의 분자량, 예를 들어 평균 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 용액은 약 2% 텍스트란 내지 약 25% 텍스트란을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 용액은 HSA를 포함하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 용액은 상기 세포, 예를 들어 상기 태반 줄기 세포와 일치하는 밀도를 갖고, 예를 들어 용액은 5%, 2%, 1%, 0.5%, 0.2% 또는 0.1%의 단리된 태반 세포의 밀도 내에 있다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 용액은 상기 세포와 일치하는 밀도를 갖지 않는다.
- [0080] 또 다른 실시양태에서, 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포를 포함하는 조성물의 제조 방법은 (a) 상기 세포를 포함하는 세포-함유 용액을 동결보존시키기 전에 여과하는 단계; (b) 세포를 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL에서 동결보존시키는 단계; (c) 세포를 해동시키는 단계; 및 (d) 세포-함유 용액을 텍스트란 40 용액에 의해 약 1:1 (v/v) 내지 약 1:11로 희석하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 약 15×10^6 개 세포를 단계 (b)에서 동결보존시킨다. 특정 실시양태에서, 세포를 단계 (b)에서 15×10^6 개 세포/mL 이하에서 동결보존시킨다. 특정 실시양태에서, 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하를 단계 (b)에서 동결보존시킨다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단계 (b)에서 세포를 약 5% 내지 약 10% 텍스트란 40 및 HSA를 포함하는 용액 중에서 동결보존시킨다.
- [0081] 또 다른 실시양태에서, 조성물의 제조 방법은

- [0082] (a) 세포, 5.5% 텍스트란 40 용액, 및 10% HSA를 포함하는 용액을 70 μm 필터를 통해 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 생성하는 단계;
- [0083] (b) 여과된 세포-함유 용액을 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA, 및 5% DMSO를 포함하는 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계;
- [0084] (d) 세포를 상기 여과된 세포-함유 용액 중에서 동결보존시키는 단계;
- [0085] (e) 세포를 해동시키는 단계; 및
- [0086] (f) 임의로 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 희석하는 단계를 포함한다.
- [0087] 특정 실시양태에서, 단계 (b)에서 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (b)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석한다. 여과된 세포-함유 용액이 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만을 포함하는 실시양태에서, 단계 (a)에서의 용액은 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 1% 내지 약 5% DMSO를 포함하고, 단계 (b)는 생략된다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11 (v/v)로 희석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:5 (v/v)로 희석하는 것을 포함한다.
- [0088] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물의 제조 방법은
- [0089] (a) 다수의 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계;
- [0090] (b) 5.5% 텍스트란 40 중에 세포를 재현탁시키는 단계;
- [0091] (c) 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계;
- [0092] (d) 세포를 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시켜, 세포-함유 용액을 생성하는 단계;
- [0093] (e) 세포-함유 용액을 70 μm 필터를 통해 여과하여, 여과된 세포-함유 용액을 생성하는 단계;
- [0094] (f) 여과된 세포-함유 용액을 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA, 및 5% DMSO 중에서 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계;
- [0095] (g) 세포를 상기 여과된 세포-함유 용액 중에서 동결보존시키는 단계;
- [0096] (h) 세포를 해동시키는 단계; 및
- [0097] (i) 임의로 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 희석하는 단계를 포함한다.
- [0098] 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석한다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 단계 (d)에서의 재현탁에 의해 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만을 포함하는 세포-함유 용액이 생성되는 실시양태에서, 단계 (d)에서의 용액은 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 1% 내지 약 5% DMSO를 포함하고, 단계 (f)는 생략된다. 일부 실시양태에서, 단계 (i)는 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:5 (v/v)로 희석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (i)는 여과된 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11 (v/v)로 희석하는 것을 포함한다.
- [0099] 임의의 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 조성물 중 DMSO의 최종 농도가 약 2.5%, 2.0%, 1.5%, 1.0%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2% 또는 약 0.1% 미만이 되도록, DMSO는 세포를 포함하는 조성물로부터 실질적으로 제거된다. DMSO의 제거는 예를 들어 세포를 원심분리하고, 세포를 10% 텍스트란 40 중에 재현탁시킴으로써 달성된다. 이러한 원심분리 및 재현탁 단계는 1회 이상 반복될 수 있다.
- [0100] 또 다른 임의의 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 상기 방법은 생성된 세포 조성물을 약 5×10^6 개 세포/mL 내

지 1×10^8 세포/mL로 농축시키는 것을 추가로 포함한다. 이러한 조성물은 예를 들어 그를 필요로 하는 개체에 게 조성물을 피하 투여하는데 유용하다.

[0101] 또 다른 임의의 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 세포는 태반 줄기 세포 이외의 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 예를 들어 세포는 줄기 세포 또는 비-줄기 세포일 수 있다. 세포가 줄기 세포인 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 예를 들어 성인 줄기 세포, 체성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 제대 줄기 세포, 양수 유체 줄기 세포, 골수-유래 중간엽 줄기 세포, 제대혈-유래 중간엽 줄기 세포, 말초혈-유래 중간엽 줄기 세포, 지방-유래 중간엽 줄기 세포 또는 골막-유래 줄기 세포일 수 있다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 천연 킬러 세포, 예를 들어 $CD3^-$, $CD56^+$ 천연 킬러 세포이다.

[0102] 또 다른 측면에서, 조성물, 예를 들어 제약 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 상기 방법에 의해 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물에는 가시성 세포 덩어리, 즉, 거대 세포 덩어리가 결핍되어 있다. 다른 특정 실시양태에서, 조성물은 여과하지 않은 조성물과 비교해서 실질적으로 감소된 수의 미세 세포 덩어리 (현미경, 예를 들어 광학 현미경 하에서만 보이는 것), 예를 들어 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 미만의 미세 세포 덩어리를 포함한다.

[0103] 한 실시양태에서, 10% 텍스트란 40을 포함하는 용액 중에 다수의 세포, 예를 들어 다수의 단리된 태반 세포, 또는 태반 관류액으로부터 단리된 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물이 본원에 제공되며, 상기 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/mL 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/mL를 포함하고, 상기 조성물은 가시성 세포 덩어리를 포함하지 않는다 (즉, 거대 세포 덩어리를 포함하지 않는다). 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 3.75×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 다른 특정 실시양태에서, 조성물은 약 1.0×10^6 개 세포/mL 내지 15×10^6 개 세포/mL, 예를 들어 약 7.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 15×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 다른 특정 실시양태에서, 조성물은 약 20×10^6 개 세포/mL 미만을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 동결보존 및 해동되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 70 μ m 내지 100 μ m 필터를 통해 여과되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 거대 세포 덩어리를 포함하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 200개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 150개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 10^6 개 세포당 약 100개 미만의 미세 세포 덩어리를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 1%, 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 또는 0.1% 미만의 DMSO를 포함한다.

[0104] 일부 실시양태에서, 조성물은 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란 40을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 5.5% 텍스트란 40을 포함한다.

[0105] 다른 실시양태에서, 상기 조성물 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 폴리사카라이드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 비-글루코스 사카라이드 서브유닛을 포함하지 않는 글루코스의 중합체이다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 말토덱스트린 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 말토덱스트린), 트레할로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 트레할로스), 또는 헤타스타치 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 헤타스타치)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 수크로스 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%,

8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 수크로스), 헤파린 (예를 들어, 55 USP 유닛/ml 헤파린), 또는 글리코겐 (예를 들어, 약 2.5%, 2.75%, 3.0%, 3.25%, 3.5%, 3.75%, 4.0%, 4.25%, 4.5%, 4.75%, 5.0%, 5.25%, 5.5%, 5.75%, 6.0%, 6.25%, 6.5%, 6.75%, 7.0%, 7.25%, 7.5%, 7.75%, 8.0%, 8.25%, 8.5%, 8.75%, 9.0%, 9.25%, 9.5%, 9.75%, 또는 10% 글리코겐)을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 이외에, 즉 대신에 말토텍스트란을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 대신에 트레할로스를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 텍스트란 뿐만 아니라 또는 대신에 헤타스타치를 포함한다.

[0106] 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1% 내지 약 17% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 또는 약 17% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 3.125% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 5% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 10% HSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 16.875% HSA를 포함한다.

[0107] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 HSA 뿐만 아니라 또는 대신에 소 혈청 알부민 (BSA) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% BSA) 또는 태아 소 혈청 (FBS) (예를 들어, 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% FBS)을 포함한다.

[0108] 일부 실시양태에서, 조성물은 동결보호제, 예를 들어 DMSO, 예를 들어 약 1% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1% 내지 약 5% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 15%, 약 2.5% 내지 약 10%, 약 5% 내지 약 15%, 약 5% 내지 약 10% 또는 약 10% 내지 약 15% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14% 또는 15% DMSO를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 약 5% DMSO를 포함한다.

[0109] 본원에 개시된 방법 중 하나에 의해 생성되는, 세포를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 세포를 포함하는 용액을 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 형성하는 단계; 여과된 세포-함유 용액을 예를 들어 동결보존시키기 전에 제1 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계; 및 생성된 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란을 포함하지만 HSA는 포함하지 않는 제2 용액에 의해 여과하여, 상기 조성물을 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성되는 세포를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다. 특정 실시양태에서, 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석한다. 특정 실시양태에서, 약 7.5×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 구체적 실시양태에서, 세포는 제1 희석 용액에 의한 상기 희석 및 상기 제2 희석 용액에 의한 상기 희석 사이에 동결보존된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 제1 희석 용액은 텍스트란 및 HSA를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 또는 상기 제2 희석 용액 중의 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 및 상기 제2 희석 용액 중의 텍스트란은 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 5.0% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 5.5% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, HSA를 포함하는 상기 용액 중의 상기 HSA는 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 HSA를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액 중의 상기 HSA는 10% HSA이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제1 희석 용액은 동결보호제를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 동결보호제는 DMSO이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 제2 희석 용액 중의 상기 텍스트란 40은 약 10% 텍스트란 40이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 조성물은 약 7.5% 내지 약 9% 텍스트란을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 조성물은 약 $1.0 \pm 0.3 \times 10^6$ 개 세포/mL 내지 약 $5.0 \pm 1.5 \times 10^6$ 개 세포/mL를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포를 포함하는 상기 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 3.75×10^6 개 세포/mL를 포함한다.

[0110] 또 다른 실시양태에서, 세포를 포함하는 조성물은 (a) 상기 세포를 포함하는 세포-함유 용액을 동결보존시키기

전에 여과하여 여과된 세포-함유 용액을 생성하는 단계; (b) 세포를 여과된 세포-함유 용액 중에 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL에서 동결보존시키는 단계; (c) 세포를 해동시키는 단계; 및 (d) 여과된 세포-함유 용액을 텍스트란 40 용액에 의해 약 1:1 내지 약 1:11 (v/v)로 희석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다. 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단계 (b)에서 세포를 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL에서 동결보존시킨다. 보다 구체적 실시양태에서, 단계 (b)에서 세포를 약 5% 내지 약 10% 텍스트란 40 및 HSA를 포함하는 용액 중에서 동결보존시킨다. 특정 실시양태에서, 단계 (d)에서 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다.

[0111] 또 다른 실시양태에서, 세포를 포함하는 조성물은 (a) 세포를 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란 40 용액 중에 현탁시켜 세포-함유 용액을 형성하는 단계; (b) 세포-함유 용액을 70 μ m 필터를 통해 여과하는 단계; (c) 세포-함유 용액을 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA, 및 5% DMSO를 포함하는 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계; (d) 세포를 동결보존시키는 단계; (e) 세포를 해동시키는 단계; 및 (f) 세포-함유 용액을 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11 (v/v)로 희석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다. 특정 실시양태에서, 단계 (b)에서 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (b)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석한다. 또 다른 실시양태에서, 세포를 포함하는 조성물은 (a) 다수의 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (b) 세포를 5.5% 텍스트란 40 중에 재현탁시키는 단계; (c) 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (d) 세포를 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시키는 단계; (e) 세포를 70 μ m 필터를 통해 여과하는 단계; (f) 세포를 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA, 및 5% DMSO 중에서 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 희석하는 단계; (g) 세포를 동결보존시키는 단계; (h) 세포를 해동시키는 단계; 및 (i) 세포를 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11 (v/v)로 희석하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 희석한다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다.

[0112] 본원에 기재된 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물은 임의의 포유동물 세포, 예컨대 포유동물 줄기 세포 및 포유동물 비-줄기 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어 제약 조성물은 단리된 태반 세포, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 단리된 태반 세포 (예를 들어 하기 섹션 5.3 참조)를 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다능성 태반 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형을 갖는 세포, 골형성 표현형을 갖는 세포, 또는 연골원성 표현형을 갖는 세포로 분화하는 잠재력을 갖는다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$ 이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 $CD80^-$ 및 $CD86^-$ 이다.

[0113] 보다 구체적 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 세포는 추가로 $CD29^+$, $CD38^-$, $CD44^+$, $CD54^+$, $CD80^-$, $CD86^-$, $SH3^+$

또는 SH4⁺ 중 하나 이상이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 CD44⁺이다. 상기 임의의 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포의 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, 및/또는 프로그래밍된 사멸-1 리간드 (PDL1)⁺ 중 하나 이상이다.

[0114] 조성물의 다른 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 CD200⁺ 및 HLA-G⁺; CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺; CD200⁺ 및 OCT-4⁺; CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺; CD73⁺ 및 CD105⁺이며, 이는 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 OCT-4⁺이며, 이는 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 이들의 임의의 조합이다. 구체적 실시양태에서, 상기 CD200⁺, HLA-G⁺ 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺ 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD200⁺, OCT-4⁺ 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺ 세포는 CD34⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD73⁺ 및 CD105⁺ 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 OCT-4⁺ 세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다. 본원에 기재된 세포를 포함하는 조성물 내에 함유될 수 있는 단리된 태반 세포는 하기 섹션 5.3에 보다 상세히 기재된다.

[0115] 본원에 제공된 조성물의 다른 특정 실시양태에서, 세포는 태반 줄기 세포 이외의 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 예를 들어 세포는 줄기 세포 또는 비-줄기 세포이다. 세포가 줄기 세포인 특정 실시양태에서, 줄기 세포는 예를 들어 성인 줄기 세포, 체성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 체대 줄기 세포, 양수 유체 줄기 세포, 골수-유래 중간엽 줄기 세포, 제대혈-유래 중간엽 줄기 세포, 말초혈-유래 중간엽 줄기 세포, 지방-유래 중간엽 줄기 세포 또는 골막-유래 줄기 세포일 수 있다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 천연 킬러 세포, 예를 들어 CD3⁻, CD56⁺ 천연 킬러 세포이다.

[0116] **5.3 단리된 태반 세포 및 단리된 태반 세포 집단**

[0117] 본원에 제공된 조성물, 예를 들어 제약 조성물에 유용한 단리된 태반 다능성 세포는 조직 배양 기관에 부착하고, 다능성 세포 또는 줄기 세포의 특징을 갖는 태반 또는 그의 일부분으로부터 획득가능한 세포이다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 유용한 단리된 태반 세포는 비-태반 세포 유형으로 분화되는 능력을 지닌다. 본원에 개시된 방법에서 유용한 단리된 태반 세포는 기원이 태아 또는 모체일 수 있다 (즉, 각각 태아 또는 모체의 유전자형을 가질 수 있다). 바람직하게는, 단리된 태반 세포 및 단리된 태반 세포의 집단은 태아 기원이다. 본원에서 사용된 "태아 기원" 또는 "비-모체 기원"이라는 구절은 단리된 태반 세포 및 단리된 태반 세포의 집단이 태아와 관련된, 즉 태아의 유전자형을 지니는 제대 또는 태반 구조물로부터 획득된다는 것을 가리킨다. 본원에서 사용된 "모체 기원"이라는 구절은 세포 또는 세포의 집단이 모체와 관련된, 예를 들어, 모체 유전자형을 지니는 태반 구조물로부터 획득된다는 것을 가리킨다. 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포들을 포함하는 세포의 집단은 기원이 단독으로 태아 또는 모체인 단리된 태반 세포를 포함할 수 있거나, 또는 태아 및 모체 기원 양쪽 모두의 단리된 태반 세포의 혼합 집단을 포함할 수 있다. 단리된 태반 세포, 및 단리된 태반 세포들을 포함하는 세포의 집단을 하기 논의된 형태학적 특징, 마커 특징, 및 배양 특징에 의해 확인 및 선별할 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 단리된 태반 세포에는 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0275362 및 미국 특허 번호 7,468,276에 기재된 것들이 포함되며, 상기 개시내용은 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0118] **5.3.1 물리적 및 형태학적 특징**

[0119] 본원에 기술된 단리된 태반 세포는, 일차 배양 또는 세포 배양에서 배양될 때, 조직 배양 기관, 예를 들어, 조직 배양 용기 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱에, 또는 세포의 매트릭스 또는 리간드, 예컨대 라미닌, 콜라겐 (예를 들어, 천연 또는 변성 콜라겐), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴, 및 세포의 막 단백질 (예를 들어, 매트릭셀(MATRIGEL®), 비디 디스커버리 랩웨어(BD Discovery Labware), 메사추세츠주 베드포드)로

코팅된 조직 배양 표면에 부착한다. 배양물 내의 단리된 태반 세포는 일반적으로 섬유모세포 모양의 정상 외관을 나타내고, 다수의 세포질 돌기가 중앙 세포 몸체로부터 확장된다. 그러나, 단리된 태반 세포가 섬유모세포보다 더 많은 수의 이같은 돌기를 나타내기 때문에 단리된 태반 세포는 동일한 조건 하에 배양된 섬유모세포로부터 형태학적으로 구별가능하다. 형태학적으로, 단리된 태반 세포는 조혈 줄기 세포로부터 또한 구별가능한데, 조혈 줄기 세포는 배양 시 더욱 둥근 형태 또는 자갈 형태를 일반적으로 나타낸다.

[0120] 5.3.2 세포 표면, 분자 및 유전적 마커

[0121] 단리된 태반 세포, 예를 들어 다능성 세포 또는 줄기 세포, 및 단리된 태반 세포의 집단은 줄기 세포, 또는 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단을 확인 및/또는 단리하는데 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현한다. 단리된 태반 세포, 및 본원에 기재된 태반 세포의 집단 (즉, 2가지 이상의 단리된 태반 세포)는 태반 또는 이의 임의의 일부분 (예를 들어, 양막, 융모막, 태반엽 등)으로부터 직접 수득되는 태반 세포 및 태반 세포-함유 세포의 집단을 포함한다. 단리된 태반 세포의 집단은 배양 중인 단리된 태반 세포들 (즉, 2가지 이상)의 집단, 및 컨테이너, 예를 들어, 백 내의 집단을 또한 포함한다. 본원에 기재된 단리된 태반 세포는 영양막세포, 세포영양막, 혈액모세포, 배아 생식 세포 또는 배아 줄기 세포가 아니다. 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용가능한 태반 다능성 세포는 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0275362, 및 미국 특허 번호 7,045,148 및 7,468,276에 기재되어 있으며, 상기 개시내용은 그의 전문이 본원에 참고로 포함되고, 하기에 기재된다.

[0122] 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, CD200, HLA-G, 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38, 또는 CD45는 발현하지 않으며, HLA-DP, DQ, 및 DR⁻이다. 단리된 다능성 세포는 또한 일반적으로 CD10⁺, CD29⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD44⁺ 및 CD38⁺이다. 특정 실시양태에서, 세포는 SSEA3⁻, SSEA4⁻ 또는 ABC-p⁺ 중 하나 이상이다. 단리된 태반 세포는 또한 HLA-ABC (MHC-I)를 발현할 수 있다. 이들 마커는 임의의 조합물로서 단리된 태반 세포, 예를 들어 단리된 태반 줄기 세포 또는 단리된 다능성 세포를 식별하고, 단리된 태반 세포를 다른 세포 유형과 구별하는데 사용될 수 있다. 단리된 태반 세포가 CD73 및 CD105를 발현할 수 있기 때문에, 이들은 중간엽 줄기 세포-유사 특징을 가질 수 있다. CD34, CD38 및/또는 CD45 발현의 결여에 의해 예를 들어 단리된 태반 세포가 비-조혈 줄기 세포임을 식별한다.

[0123] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 다른 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 다능성 세포이다. 한 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 다능성 태반 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 신경 표현형을 갖는 세포, 골형성 표현형을 갖는 세포, 또는 연골원성 표현형을 갖는 세포로 분화하는 잠재력을 갖는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD45⁻ 또는 CD90⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 CD45⁻ 및 CD90⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 CD90⁺ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 CD90⁺ 및 CD45⁻이며, 즉, 세포는 CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 CD34⁻, CD10⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ 세포는 추가로 CD80⁻ 및 CD86⁻이다.

[0124] 구체적 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 세포는 추가로 CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ 또는 SH4⁺ 중 하나 이상이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 CD44⁺이다. 상기 임의의 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포의 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포는 추가로 CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, 및/또는 PDL1⁺ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻,

SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁺, 또는 프로그래밍된 사멸-1 리간드 (PDL1)⁺ 중 하나 이상이거나, 또는 이들의 임의의 조합이다. 보다 구체적 실시양태에서, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-P⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁺, 및 프로그래밍된 사멸-1 리간드 (PDL1)⁺이다.

[0125] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포가 CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺ 태반 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상의 세포가 CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺ 태반 세포이다. 보다 바람직하게는, 약 90%, 95%, 또는 99% 이상의 상기 세포가 CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 CD90⁺ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포는 유세포 분석법에 의해 검출되는 바와 같이 추가로 CD90⁺ 및 CD45⁻이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 기재된 임의의 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ 또는 SH4⁺ 중 하나 이상이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포, 또는 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포는 추가로 CD44⁺이다. 상기 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포를 포함하는 임의의 세포의 집단의 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 추가로 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁺, 또는 프로그래밍된 사멸-1 리간드 (PDL1)⁺ 중 하나 이상이거나, 또는 이들의 임의의 조합이다. 보다 구체적 실시양태에서, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 세포는 추가로 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁺, 및 프로그래밍된 사멸-1 리간드 (PDL1)⁺이다.

[0126] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, 및 ABC-p⁺ 중 하나 이상 또는 이들 모두이고, 여기서 상기 단리된 태반 세포는 태반 조직의 물리적 및/또는 효소에 의한 파괴에 의해 수득된다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 ABC-p⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻이며, 여기서 상기 단리된 태반 세포는 하기 특징 중 적어도 하나를 갖는다: CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻이고, SH2⁺ 또는 SH3⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SH2⁺, 및 SH3⁺이다. 또 다

른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이고, SH2⁺ 또는 SH3⁺이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻이고, SH2⁺ 또는 SH3⁺이고, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, 또는 SSEA4⁻ 중 적어도 하나이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이고, SH2⁺ 또는 SH3⁺이다.

[0127] 한 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD200⁺ 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺ 단리된 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 줄기 또는 다능성 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 이들 마커를 나타내지 않는 태반 줄기 세포로부터 단리된다.

[0128] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포는 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상의 세포는 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 세포이다. 보다 바람직하게는, 약 90%, 95%, 또는 99% 이상의 상기 세포는 CD200⁺, HLA-G⁺ 태반 세포이다. 단리된 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 또한 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 세포의 집단은 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포의 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0129] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 이용가능한 태반 세포는 CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, 및 CD200⁺ 태반 세포는 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아 유사체의 형성을 용이하게 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0130] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 단리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상의 상기 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 90%, 95% 또는 99% 이상의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적

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

[0131] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 CD200⁺ 및 OCT-4⁺이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 단리된 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에 의해 하나 이상의 배아-유사체의 생성을 용이하게 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0132] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포는 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 약 70% 이상의 상기 세포는 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 80%, 90%, 95%, 또는 99% 이상의 세포는 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포이다. 단리된 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포의 집단은 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 하나 이상의 배아-유사체를 형성한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 단리된 CD200⁺, OCT-4⁺ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0133] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 상기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태

반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0134] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 및 HLA-G⁺ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 90%, 95% 또는 99% 이상의 세포는 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0135] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이고, 이는 상기 CD73⁺, CD105⁺ 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0136] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 CD73⁺, CD105⁺인 단리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이며, 이는 상기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포는 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상의 세포는 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 90%, 95% 또는 99% 이상의 세포는 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, OCT-4⁺ 및 CD200⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 상기 단리된 CD73⁺, CD105⁺ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반

세포로부터 단리된다.

[0137] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺이며, 이는 상기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻, 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 OCT-4⁺ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0138] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 OCT-4⁺인 단리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이며, 이는 상기 세포를 포함하는 단리된 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 다양한 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 또는 약 60% 이상의 세포는 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상의 세포는 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 80%, 90%, 95% 또는 99% 이상의 세포는 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포이다. 상기 집단의 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺ 태반 세포는 추가로 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0139] 다른 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, OCT-4⁺, MHC-I⁺ 또는 ABC-p⁺ 중 하나 이상이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, 및 SH4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, HLA-I⁺, SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 ABC-p⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 SH2⁺, SH3⁺, SH4⁺ 및 OCT-4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 OCT-4⁺, CD34⁻, SSEA3⁻, 및 SSEA4⁻ 태반 세포는 추가로 CD10⁺, CD29⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD90⁺, SH2⁺, SH3⁺, 및 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 OCT-4⁺ 및 CD34⁻이고, SH3⁺ 또는 SH4⁺이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁻이고, CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD54⁺, CD90⁺, 또는 OCT-4⁺이다.

[0140] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 단리된 CD10⁺, CD34⁻,

CD105⁺, 및 CD200⁺ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상의 상기 세포의 집단이 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포인 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이다. 상기 실시양태의 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 추가로 CD90⁺ 및 CD45⁻이다. 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포 또는 태반 세포의 집단은 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포 또는 태반 세포의 집단은 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포의 집단 중 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 99% 이상의 상기 세포는 비-모체 기원이다.

[0141] 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 또는 집단이 확장되었고, 예를 들어, 최소, 대략 또는 최대 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 15회, 16회, 17회, 18회, 19회 또는 20회 계대되거나, 또는 최소, 대략 또는 최대 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 20회, 22회, 24회, 26회, 28회, 30회, 32회, 34회, 36회, 38회 또는 40회 개체수 배가로 증식되었다. 본원에 개시된, 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태아 기원이다 (즉, 태아 유전자형을 지닌다).

[0142] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 이용가능한 태반 세포는 OCT-4⁺이며, 이는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양될 때 상기 단리된 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD34⁻, CD38⁻, 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD200⁺이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 줄기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0143] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 단리된 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 상기 세포의 단리된 집단 중 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상의 세포가 단리된 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻ 태반 세포인 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 HLA-A,B,C⁻, CD45⁻, CD133⁻ 및 CD34⁻ 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포의 집단은 실질적으로 모체 성분을 함유하지 않고, 예를 들어 상기 단리된 태반 세포의 집단 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상기 세포가 비-모체 기원이다.

[0144] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 단리된 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상의 세포가 단리된 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻ 태반 세포인 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 상기 단리된 태반 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 CD10⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD45⁻, CD117⁻ 및 CD133⁻ 태반 세포는 비-모체 기원이며, 즉, 태아 유전자형을 갖는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포의 집단 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0145] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 단리된 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 단리된 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들 세포에 대해 강화된 세포의 집단이며, 여기서 상기 세포의 집단 중 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상의 세포가 단리된 CD10⁻, CD33⁻, CD44⁺, CD45⁻, 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0146] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 단리된 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 유용한 세포의 집단은 단리된 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻ 태반 세포를 포함하는, 예를 들어 이들에 대해 강화된 세포의 집단이며, 여기서 상기 집단 중 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 99% 이상의 세포는 CD10⁻, CD13⁻, CD33⁻, CD45⁻, 및 CD117⁻ 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 이들 특징을 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0147] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 HLA A,B,C⁺, CD45⁻, CD34⁻, 및 CD133⁻이며, 추가로 CD10⁺, CD13⁺, CD38⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺ 및/또는 HLA-G⁺이고/이거나, CD117에 대해 음성이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단이며, 여기서 상기 집단 중 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 약 99% 이상의 세포는 HLA A,B,C⁻, CD45⁻, CD34⁻, CD133⁻이고, 추가로 CD10, CD13, CD38, CD44, CD90, CD105, CD200 및/또는 HLA-G에 대해 양성이고/이거나, CD117에 대해 음성인 단리된 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 상기 세포가 아닌 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상기 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 이들 마커를 디스플레이하지 않는 태반 세포로부터 단리된다.

[0148] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 항체 결합에 의해 결정되는 바와 같이 CD200⁺ 및 CD10⁺이고, 항체 결합 및 RT-PCR 둘 다에 의해 결정되는 바와 같이 CD117⁻인 단리된 태반 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁻, CD54⁺, CD200⁺, HLA-G⁺, HLA 클래스 I⁻ 및 β-2-마이크로글로불린⁻인 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는, 하나 이상의 세포 마커의 발현이 중간엽 줄기 세포 (예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포)에 대한 것보다 2배 이상인 더 높은 것인 태반 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 90%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 상기 세포는 비-모체 기원이다.

[0149] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 단리된 태반 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-

카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, β2-마이클로글로불린^{low}, MHC-I^{low}, MHC-II⁻, HLA-G^{low}, 및/또는 PDL1^{low} 중 하나 이상인 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD29⁺ 및 CD54⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD44⁺ 및 CD106⁺이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 적어도 CD29⁺이다.

[0150] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용가능한 세포의 집단은 단리된 태반 세포를 포함하며, 상기 세포의 집단 중 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, β2-마이클로글로불린^{low}, MHC-I^{low}, MHC-II⁻, HLA-G^{low}, 및/또는 PDL1^{low} 중 하나 이상인 단리된 태반 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단 중 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 세포는 CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62-E⁻, CD62-L⁻, CD62-P⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD103⁻, CD104⁻, CD105⁺, CD106/VCAM⁺, CD144/VE-카드헤린^{low}, CD184/CXCR4⁻, β2-마이클로글로불린^{low}, MHC-I^{low}, MHC-II⁻, HLA-G^{low}, 및 PDL1^{low}이다.

[0151] 단리된 태반 세포의 특정 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 성장 배지, 즉, 증식을 촉진하도록 제제화된 배지에서 배양되는 동안, 예를 들어, 성장 배지에서의 증식 동안 분화되지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 증식하기 위해 피더 층을 필요로 하지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 전적으로 피더 세포층의 부재로 인해, 상기 단리된 태반 세포는 피더 층의 부재 하에 배양물에서 분화되지 않는다.

[0152] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 이용가능한 세포는 다수의 단리된 태반 세포가 알데히드 데히드로게나제 활성 검정에 의해 평가했을 때 알데히드 데히드로게나제 (ALDH)에 대해 양성인 단리된 태반 세포이다. 이같은 검정은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Bostian and Betts, Biochem. J., 173, 787, (1978)] 참조). 구체적 실시양태에서, 상기 ALDH 분석법은 알데플루어(ALDEFLUOR®, 알다젠, 인크.(Aldagen, Inc.), 오레곤주 애쉬랜드)를 알데히드 데히드로게나제 활성의 마커로 사용한다. 구체적 실시양태에서, 상기 다수는 상기 세포의 집단 내의 세포의 약 3% 내지 약 25%이다. 또 다른 실시양태에서, 알데플루어®를 알데히드 데히드로게나제 활성의 지표로 사용하는 알데히드 데히드로게나제 활성 검정에 의해 평가했을 때 다수의 단리된 태반 세포가 알데히드 데히드로게나제에 대해 양성인, 단리된 태반 세포, 예를 들어, 다능성의 단리된 태반 세포의 집단이 본원에서 제공된다. 구체적 실시양태에서, 상기 다수는 상기 세포의 집단 내의 세포의 약 3% 내지 약 25%이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단은 세포수가 대략 동일하고 동일한 조건 하에 배양된 골수-유래 중간엽 줄기 세포의 집단보다 3배 이상, 또는 5배 이상 더 높은 ALDH 활성을 나타낸다.

[0153] 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포 또는 집단이 확장되었고, 예를 들어, 최소, 대략 또는 최대 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 15회, 16회, 17회, 18회, 19회 또는 20회 계대되거나, 또는 최소, 대략 또는 최대 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 20회, 22회, 24회, 26회, 28회, 30회, 32회, 34회, 36회, 38회 또는 40회 개체수 배가로 증식되었다. 본원에 개시된, 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 태아 기원이다 (즉, 태아 유전자형을 지닌다).

[0154] 임의의 상기 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 세포의 집단의 구체적 실시양태에서, 세포, 또는 상기 집단 내의 세포의 약 95% 또는 약 99% 이상의 핵형이 정상이다. 임의의 상기 태반 세포 또는 세포의 집단의 또 다른 구체적 실시양태에서, 세포, 또는 세포의 집단 내의 세포는 비-모체 기원이다.

[0155] 임의의 상기 마커 조합을 보유하는, 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단이 임의의 비율로 조합될 수 있다. 임의의 2가지 이상의 상기 단리된 태반 세포의 집단이 조합되어 단리된 태반 세포의 집단을 형성할 수 있다. 예를 들어, 단리된 태반 세포의 집단이 상기 기술된 마커 조합들 중 하나에 의해 정의되는 단리된 태반 세포의 제1 집단, 및 또 다른 상기 기술된 마커 조합에 의해 정의되는 단리된 태반 세포의 제2 집단을 포함할 수 있고, 이때 상기 제1 집단과 제2 집단은 약 1:99, 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2 또는 약 99:1의 비율로 조합된다. 유사

한 방식으로, 상기 기술된 단리된 태반 세포 또는 단리된 태반 세포의 집단 중 임의의 3가지, 4가지, 5가지 또는 그 이상이 조합될 수 있다.

- [0156] 본원에 제공된 조성물 및 방법에 이용가능한 단리된 태반 세포를, 효소 소화 (섹션 5.4.3 참조) 또는 관류 (섹션 5.4.4 참조)와 함께 또는 이러한 처리 없이, 태반 조직의 파괴에 의해 예를 들어 수득할 수 있다. 예를 들어, 제대혈이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 포유동물 태반을 관류시키는 단계; 상기 태반에 관류 용액을 관류시키는 단계; 및 상기 관류 용액을 수집하고, 이때 관류 후의 상기 관류 용액이 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 포함하는 단계; 및 상기 세포의 집단으로부터 다수의 상기 단리된 태반 세포를 단리하는 단계를 포함하는 방법에 따라 단리된 태반 세포의 집단이 생산될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 관류 용액이 제대 정맥 및 제대 동맥 양쪽 모두를 통과하고, 태반으로부터 삼출된 후 수집된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류 용액이 제대 정맥을 통과하고 제대 동맥으로부터 수집되거나, 또는 제대 동맥을 통과하고 제대 정맥으로부터 수집된다.
- [0157] 다양한 실시양태에서, 태반의 관류로부터 수득된 세포의 집단 내에 함유된 단리된 태반 세포는 상기 태반 세포의 집단의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 이상 또는 99.5% 이상이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류에 의해 수집된 단리된 태반 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류에 의해 수집된 단리된 태반 세포는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 이상 또는 99.5% 이상 태아 세포이다.
- [0158] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 관류에 의해 수집된, 본원에 기술된 바와 같은 단리된 태반 세포의 집단을 포함하고, 이때 조성물이 단리된 태반 세포를 수집하는데 사용된 관류 용액의 적어도 일부분을 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0159] 본원에 기술된 단리된 태반 세포의 단리된 집단은 태반 조직을 조직-파괴 효소로 소화시켜 이러한 세포를 포함하는 태반 세포의 집단을 수득하고, 다수의 태반 세포를 나머지 태반 세포로부터 단리하거나 또는 실질적으로 단리함으로써 생산될 수 있다. 본원에 기술된 단리된 태반 세포를 수득하기 위해 전체 태반 또는 이의 임의의 일부가 소화될 수 있다. 예를 들어, 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 조직은 전체 태반, 양막, 용모막, 양막과 용모막의 조합물, 또는 임의의 상기의 것들의 조합물이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조직 파괴 효소는 트립신 또는 콜라게나제이다. 다양한 실시양태에서, 태반 소화로부터 수득된 세포의 집단 내에 함유된 단리된 태반 세포는 상기 태반 세포의 집단의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 이상 또는 99.5% 이상이다.
- [0160] 유전자 프로파일링(profiling)에서, 단리된 태반 세포, 및 단리된 태반 세포의 집단이 다른 세포, 예를 들어, 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포와 구별된다는 것이 확인된다. 유전자의 발현이 골수-유래 중간엽 줄기 세포와 비교하여 단리된 태반 세포에서 또는 단리된 특정 제대 줄기 세포에서 유의하게 더 높은 하나 이상의 유전자의 발현을 기초로, 본원에 기술된 단리된 태반 세포가, 예를 들어, 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수 있다. 특히, 유전자의 발현이 동등한 개수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 단리된 태반 세포에서 유의하게 더 높은 (즉, 2배 이상 더 높은) 하나 이상의 유전자의 발현을 기초로 본원에서 제공되는 조성물 및 방법에 이용가능한 단리된 태반 세포가 중간엽 줄기 세포로부터 구별될 수 있고, 이때 이러한 하나 이상의 유전자는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPRC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUA1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, ZC3H12A, 또는 이러한 유전자들 중 임의의 것의 조합이고, 세포들은 동등한 조건 하에 배양된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0275362를 참조하고, 이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 DMEM-LG (깃코); 2% 소 태아 혈청 (하이클론 랩스.); 1× 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS); 1× 리놀레산-소 혈청 알부민 (LA-BSA); 10⁻⁹ M 텍사메타손 (시그마); 10⁻⁴ M 아스코르브산 2-포스페이트 (시그마); 표피 성장 인자 10 ng/ml (알앤디 시스템즈); 및 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/ml (알앤디 시스템즈)를 포함하는 배지에서 약 3회 내지 약 35회 개체수 배가 동안 배양되는 경우 상기 하나 이상의 유전자를 발현한다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 태반 세포-특이적 또는 단리된 제대 세포-특이적 유전자는 CD200이다.
- [0161] 이러한 유전자들에 대한 구체적인 서열을 2008년 3월 현재 진뱅크(GenBank)에서 접속 번호 NM_001615 (ACTG2), BC065545 (ADARB1), NM_181847 (AMIGO2), AY358590 (ARTS-1), BC074884 (B4GALT6), BC008396 (BCHE), BC020196 (C11orf9), BC031103 (CD200), NM_001845 (COL4A1), NM_001846 (COL4A2), BC052289 (CPA4), BC094758 (DMD), AF293359 (DSC3), NM_001943 (DSG2), AF338241 (ELOVL2), AY336105 (F2RL1), NM_018215

(FLJ10781), AY416799 (GATA6), BC075798 (GPR126), NM_016235 (GPC5B), AF340038 (ICAM1), BC000844 (IER3), BC066339 (IGFBP7), BC013142 (IL1A), BT019749 (IL6), BC007461 (IL18), (BC072017) KRT18, BC075839 (KRT8), BC060825 (LIPG), BC065240 (LRAP), BC010444 (MATN2), BC011908 (MEST), BC068455 (NFE2L3), NM_014840 (NUAK1), AB006755 (PCDH7), NM_014476 (PDLIM3), BC126199 (PKP-2), BC090862 (RTN1), BC002538 (SERPINB9), BC023312 (ST3GAL6), BC001201 (ST6GALNAC5), BC126160 또는 BC065328 (SLC12A8), BC025697 (TCF21), BC096235 (TGFB2), BC005046 (VTN), 및 BC005001 (ZC3H12A)에서 확인할 수 있다.

[0162] 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 세포들이 동등한 조건 하에 배양되는 경우 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, 및 ZC3H12A 각각을 동등한 개수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 높은 수준으로 발현한다.

[0163] 보다 구체적 실시양태에서, 태반 세포의 집단은 하나 이상의 유전자를 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 높은 수준으로 발현하는 태반 세포를 선택함으로써 선별될 수 있으며, 여기서 상기 하나 이상의 유전자는 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN, 및 ZC3H12A로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 골수-유래 줄기 세포는 상기 태반 줄기 세포에 진행된 계대 횟수와 동등한 횟수로 계대 배양되었다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 선별은 ACTG2, ADARB1, AMIGO2, ARTS-1, B4GALT6, BCHE, C11orf9, CD200, COL4A1, COL4A2, CPA4, DMD, DSC3, DSG2, ELOVL2, F2RL1, FLJ10781, GATA6, GPR126, GPC5B, HLA-G, ICAM1, IER3, IGFBP7, IL1A, IL6, IL18, KRT18, KRT8, LIPG, LRAP, MATN2, MEST, NFE2L3, NUAK1, PCDH7, PDLIM3, PKP2, RTN1, SERPINB9, ST3GAL6, ST6GALNAC5, SLC12A8, TCF21, TGFB2, VTN 및 ZC3H12A를 골수-유래 중간엽 줄기 세포보다 검출가능하게 높은 수준으로 발현하는 세포를 선별하는 것을 포함한다.

[0164] 상기 언급된 유전자들의 발현을 표준 기술에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어, 통상적인 기술에 의해 유전자(들)의 서열을 기초로 하는 프로브들을 개별적으로 선택하여 구축할 수 있다. 예를 들어, 유전자들 중 하나 이상에 대한 프로브를 포함하는 마이크로어레이, 예를 들어, 어피메트릭스(Affymetrix)의 젠칩(GENECHIP®) 인간 게놈 U133A 2.0 어레이, 또는 어피메트릭스의 젠칩® 인간 게놈 U133 플러스 2.0 (캘리포니아주 산타 클라라) 상에서 유전자의 발현을 평가할 수 있다. 특정 진뱅크 접속 번호에 대한 서열이 수정되더라도 이러한 유전자들의 발현을 평가할 수 있는데, 수정된 서열에 대해 특이적인 프로브가 주어진 표준 기술을 사용하여 쉽게 생성될 수 있기 때문이다.

[0165] 이러한 유전자들의 발현 수준은 단리된 태반 세포의 집단의 신원을 입증하는 것, 적어도 다수의 단리된 태반 세포들을 포함하는 것으로 세포의 집단을 확인하는 것 등에 사용될 수 있다. 신원이 입증된, 단리된 태반 세포의 집단은 클론성일 수 있고, 예를 들어, 단일한 단리된 태반 세포로부터 확장된 단리된 태반 세포의 집단, 또는 줄기 세포들의 혼합 집단, 예를 들어, 여러 단리된 태반 세포들로부터 확장된 단리된 태반 세포들만을 포함하는 세포의 집단, 또는 본원에 기술된 바와 같은 단리된 태반 세포들 및 하나 이상의 또 다른 유형의 세포를 포함하는 세포의 집단일 수 있다.

[0166] 이러한 유전자들의 발현 수준은 단리된 태반 세포의 집단을 선별하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 열거된 유전자들 중 하나 이상의 발현이 중간엽 줄기 세포들의 동등한 집단에서보다 세포의 집단으로부터의 샘플에서 유의하게 더 높은 경우 세포들, 예를 들어, 클론-확장 세포의 집단이 선별될 수 있다. 이같은 선별은 다수의 단리된 태반 세포의 집단, 신원이 알려지지 않은 다수의 세포의 집단 등으로부터의 집단의 선별일 수 있다.

[0167] 단리된 태반 세포를 하나 이상의 이같은 유전자의 발현 수준을 기초로, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 대조군에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준, 예를 들어, 동등한 개수의 골수-유래 중간엽 줄기 세포에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준과 비교하여 선별할 수 있다. 한 실시양태에서, 동등한 개수의 중간엽 줄기 세포를 포함하는 샘플에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준이 대조군으로 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 특정 조건 하에 시험된 단리된 태반 세포에 대한 대조군은 상기 조건 하에서의 중간엽 줄기 세포에서의 상기 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 나타내는 수치이다.

[0168] 본원에 기술된 단리된 태반 세포는 DMEM-LG (김코), 2% 소 태아 혈청 (FCS) (하이클론 래버러토리즈(Hyclone

Laboratories)), 1× 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS), 1× 레놀렌산-소 혈청 알부민 (LA-BSA), 10⁻⁹ M 텍사메타손 (시그마), 10⁻⁴ M 아스코르브산 2-포스페이트 (시그마), 표피 성장 인자 (EGF) 10 ng/ml (알앤디 시스템즈), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF-BB) 10 ng/ml (알앤디 시스템즈), 및 100U 페니실린/1000U 스트렙토마이신을 예를 들어 포함하는 배지에서 일차 배양에서 또는 증식 동안 상기 특성 (예를 들어, 세포 표면 마커 및/또는 유전자 발현 프로파일의 조합)을 디스플레이한다.

[0169] 상기 기재된 태반 세포의 단리된 집단, 및 단리된 태반 세포의 집단은 일반적으로 대략, 최소 또는 최대 1 x 10⁵, 5 x 10⁵, 1 x 10⁶, 5 x 10⁶, 1 x 10⁷, 5 x 10⁷, 1 x 10⁸, 5 x 10⁸, 1 x 10⁹, 5 x 10⁹, 1 x 10¹⁰, 5 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹ 또는 그 이상의 단리된 태반 세포를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 조성물 및 방법에 이용가능한 단리된 태반 세포의 집단은 예를 들어 트리판 블루 배체에 의해 측정시 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 이상의 생존성 단리된 태반 세포를 포함한다.

[0170] 5.3.3 배양물에서의 성장

[0171] 본원에 기술된 단리된 태반 세포의 성장은, 임의의 포유동물 세포에 대해서와 같이, 성장에 선택된 특정 배지에 부분적으로 좌우된다. 최적의 조건 하에, 단리된 태반 세포는 전형적으로 3 내지 5일 내에 개수가 배가된다. 배양 동안, 본원에 기술된 단리된 태반 세포는 배양 시의 기관, 예를 들어 조직 배양 컨테이너 (예를 들어, 조직 배양 접시 플라스틱, 피브로넥틴-코팅 플라스틱 등)의 표면에 부착하여, 단층을 형성한다.

[0172] 본원에 기술된 단리된 태반 세포의 집단은, 적합한 조건 하에 배양될 때, 배아-유사체를 형성하고, 즉, 세포의 3차원 클러스터가 부착성 줄기 세포층의 상부에서 성장한다. 배아-유사체 내의 세포는 극초기 줄기 세포와 관련된 마커, 예를 들어, OCT-4, Nanog, SSEA3 및 SSEA4를 발현한다. 전형적으로 배아-유사체 내의 세포는 본원에 기술된 단리된 태반 세포가 부착성인 것과 같이 배양 기관에 대해 부착성이지만, 배양 동안 이러한 부착성 세포에 계속 부착된다. 배아-유사체 세포는 생존성을 위해 부착성의 단리된 태반 세포에 의존적인데, 이는 부착성의 단리된 태반 세포의 부재 하에 배아-유사체가 형성되지 않기 때문이다. 따라서 부착성의 단리된 태반 세포는 부착성의 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 성장을 촉진한다. 이론에 의해 제한되기를 원치 않으면서, 배아 줄기 세포가 피더 세포층 상에서 성장하는 것과 같이 배아-유사체의 세포가 부착성의 단리된 태반 세포 상에서 성장하는 것으로 생각된다. 중간엽 줄기 세포, 예를 들어 골수-유래 중간엽 줄기 세포는 배양물에서 배아-유사체를 발생시키지 않는다.

[0173] 5.3.4 조혈 태반 줄기 세포

[0174] 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁺ 태반 세포, 예를 들어 조혈 태반 세포이다. 그러나, 이러한 CD34⁺ 세포는 본원에 사용된 용어 "다능성"에 포함되지 않는다. 이러한 세포는 태반 조직, 예를 들어 재대혈이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 태반으로부터 수득가능하다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 단리된 태반 세포는 CD38⁺이다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 단리된 태반 세포는 CD38⁻이다. 다른 특정 실시양태에서, CD34⁺ 단리된 태반 세포는 CD45⁺이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁺, CD38⁻ 및 CD45⁺이다.

[0175] 5.3.5 태반 관류액 세포

[0176] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 제제화된, 본원에 제공된 조성물의 세포는 태반 관류액으로부터 수득된 세포이다. 본원에 사용된 "태반 관류액으로부터 수득된 세포"에는 태반 관류액으로부터 수득된, 예를 들어 그로부터 단리된 전체 유핵 세포, 태반 관류액으로부터 수득된 유핵 세포의 하위세트, 또는 태반 관류액으로부터 수득된 세포로부터 배양 또는 증식된 세포가 포함된다. 태반 관류액은, 태반 세포를 수득하기 위해 관류하기 전에, 재대혈이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 태반으로부터 수득될 수 있다. 태반 관류액은 재대혈이 배출되었으나, 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지 않은 태반으로부터 수득될 수 있다. 태반 관류액은 재대혈이 배출되지 않았고 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지 않은 태반으로부터 수득될 수 있다. 상기 두 후자의 실시양태에서, 태반 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포는 태반 혈액 및/또는 재대혈로부터의 유핵 세포를 포함한다. 태반 관류액을 수득하고, 태반 관류액으로부터 세포를 수득하는 방법은 하기 섹션 5.4.4에 기재되어 있다.

[0177] 5.4 단리된 태반 세포를 수득하는 방법

[0178] 5.4.1 줄기 세포 수집 조성물

[0179] 태반 세포, 예를 들어, 상기 섹션 5.2에 기술된 단리된 태반 세포를 수집하고 단리하는 방법이 본원에서 추가로 제공된다. 일반적으로, 이같은 세포는 생리학적으로 허용가능한 용액, 예를 들어 줄기 세포 수집 조성물을 사용하여 포유동물 태반으로부터 수득된다. 세포 수집 조성물이 발명의 영문 명칭이 "Improved Medium for Collecting Placental Stem Cells and Preserving Organs"인 관련된 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0190042에 상세하게 기술되어 있다.

[0180] 세포 수집 조성물은 세포, 예를 들어, 본원에 기술된 단리된 태반 세포의 수집 및/또는 배양에 적절한 임의의 생리학적으로 허용가능한 용액, 예를 들어, 염수 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수, 크랩 용액, 변형 크랩 용액, 이글 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0181] 세포 수집 조성물은 단리된 태반 세포를 보존하는 경향이 있는, 즉, 수집 시간에서 배양 시간까지, 단리된 태반 세포의 사멸을 방지하는 것, 또는 단리된 태반 세포의 사멸을 지연시키는 것, 사멸하는 세포의 집단 내의 단리된 태반 세포의 수를 감소시키는 것 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이같은 성분은, 예를 들어, 아포토시스 억제제 (예를 들어, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제 (예를 들어, 황산마그네슘, 항-고혈압 약물, 심방 나트륨이노 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 나트륨 니트로프루시드, 히드랄라진, 아데노신 트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포디에스테라제 억제제 등); 피사 억제제 (예를 들어, 2-(1H-인돌-3-일)-3-벤질아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카르바메이트, 또는 클로나제팜); TNF- α 억제제; 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0182] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, RNase, 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 이같은 효소에는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리디움 히스틀리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 썬모리신, 엘라스타제, 트립신, 리베라제(LIBERASE), 히알루로니다제 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0183] 세포 수집 조성물은 살균 유효량 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 비-제한적인 특정 실시양태에서, 항생제는 마크롤리드 (예를 들어, 토브라마이신), 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 V) 또는 퀴놀론 (예를 들어, 오플록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시양태에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 박테리아, 예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.

[0184] 세포 수집 조성물은 하기 화합물들 중 하나 이상을 또한 포함할 수 있다: 아데노신 (약 1 mM 내지 약 50 mM); D-글루코스 (약 20 mM 내지 약 100 mM); 마그네슘 이온 (약 1 mM 내지 약 50 mM); 분자량이 20,000 달톤을 초과하는 거대분자 (한 실시양태에서, 내피 온전성 및 세포 생존성을 유지하는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 합성 또는 천연 발생 콜로이드, 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜 (약 25 g/l 내지 약 100 g/l, 또는 약 40 g/l 내지 약 60 g/l 으로 존재)); 항산화제 (예를 들어, 부틸화 히드록시안니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E (약 25 μ M 내지 약 100 μ M로 존재)); 환원제 (예를 들어, N-아세틸시스테인 (약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재)); 세포 내로의 칼슘 유입을 방지하는 작용제 (예를 들어, 베라파밀 (약 2 μ M 내지 약 25 μ M로 존재)); 니트로글리세린 (예를 들어, 약 0.05 g/l 내지 약 0.2 g/l); 항응고제 (한 실시양태에서, 잔류 혈액의 응고를 방지하는데 충분한 양으로 존재) (예를 들어, 헤파린 또는 히루딘 (약 1000 유닛/l 내지 약 100,000 유닛/l 의 농도로 존재)); 또는 아밀로리드 함유 화합물 (예를 들어, 아밀로리드, 에틸 이소프로필 아밀로리드, 헥사메틸렌 아밀로리드, 디메틸 아밀로리드 또는 이소부틸 아밀로리드 (약 1.0 μ M 내지 약 5 μ M로 존재)).

[0185] 5.4.2 태반의 수집 및 취급

[0186] 일반적으로, 인간 태반은 출산 후 이의 만출 직후에 회수된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 환자로부터 사전 동의 후에, 그리고 이 환자의 완전한 병력을 취하여 태반과 관련시킨 후에 회수된다. 바람직하게는, 병력이 분만 이후에 계속된다. 이같은 병력은 태반 또는 이로부터 수확된 줄기 세포의 후속 사용을 조정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 태반 줄기 세포는, 병력에 비추어서, 태반에 관련된 영아 또는 영아의 부모, 형제자매 또는 기타 친척의 개인화(personalized) 의약에 사용될 수 있다.

- [0187] 단리된 태반 세포의 회수 전에, 제대혈 및 태반혈이 제거된다. 특정 실시양태에서, 분만 후, 태반 내의 제대혈이 제거된다. 통상적인 제대혈 회수 공정이 태반에 적용될 수 있다. 전형적으로, 바늘 또는 캐놀러(cannula)가, 중력의 보조와 함께, 태반을 방혈시키는데 사용된다 (미국 특허 번호 5,372,581 (Anderson), 미국 특허 번호 5,415,665 (Hessel 등) 참조). 바늘 또는 캐놀러는 일반적으로 제대 정맥에 놓이고, 태반으로부터 제대혈이 배출되는 것을 돕도록 태반을 부드럽게 마사지할 수 있다. 이같은 제대혈 회수는 상업적으로, 예를 들어 LifeBank USA, Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry 및 CryoCell에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 제대혈 회수 동안의 조직 파괴를 최소화하도록 태반이 추가적인 조작 없이 중력에 의해 배수된다.
- [0188] 전형적으로, 제대혈의 회수 및 줄기 세포의 수집을 위해 (예를 들어, 관류 또는 조직 해리에 의해), 태반은 분만실 또는 출산실에서 또 다른 장소, 예를 들어 실험실로 수송된다. 바람직하게는 태반은 무균성의 단열 수송장치 (태반의 온도를 20°C 내지 28°C 사이에서 유지시킴)에서 수송되고, 예를 들어, 근위부 제대를 집게로 집은 태반을 무균성 zip-락(zip-lock) 플라스틱 백에 놓은 후, 이를 단열 컨테이너에 놓는다. 또 다른 실시양태에서, 실질적으로 계류 중인 미국 특허 번호 7,147,626에 기술된 바와 같이 제대혈 수집 키트 내에서 태반이 수송된다. 바람직하게는, 태반은 분만 후 4시간 내지 24시간 내에 실험실로 수송된다. 특정 실시양태에서, 근위부 제대가, 바람직하게는 태반 원반 내로의 삽입부의 4-5 cm 이내에서, 제대혈 회수 전에 집게로 집어진다. 또 다른 실시양태에서, 근위부 제대는 제대혈 회수 후에, 그러나 태반의 추가적인 프로세싱 전에 집게로 집어진다.
- [0189] 세포 수집 전에, 무균성 조건 하에 실온 또는 5 내지 25°C의 온도 (섭씨 온도)에서 태반이 보관될 수 있다. 임의의 잔류 제대혈을 제거하기 위해 태반을 관류하기 전에 4시간 내지 24시간, 48시간 이하, 또는 48시간을 초과하는 시간의 기간 동안 태반이 보관될 수 있다. 한 실시양태에서, 만출 후 약 0시간 내지 약 2시간에 태반이 수확된다. 바람직하게는, 태반은 5 내지 25°C의 온도 (섭씨 온도)에서 항응고제 용액 내에서 보관된다. 적절한 항응고제 용액이 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와파린 소듐(warfarin sodium)의 용액이 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액 (예를 들어, 1:1000 용액 내의 1% w/w)을 포함한다. 바람직하게는, 방혈된 태반이 36시간 이하 동안 보관된 후, 태반 세포가 수집된다.
- [0190] 일단 일반적으로 상기와 같이 수집 및 제조되면, 포유동물 태반 또는 이의 일부분을 단리된 태반 세포를 수득하기 위해 임의의 당업계에 공지된 방식으로 처리할 수 있고, 예를 들어, 관류시키거나 또는 파괴할 수 있으며, 예를 들어, 하나 이상의 조직 파괴 효소로 소화시킬 수 있다.
- [0191] 5.4.3 태반 조직의 물리적 파괴 및 효소에 의한 소화
- [0192] 한 실시양태에서, 줄기 세포가 포유동물 태반으로부터 이러한 기관의 일부분 또는 전체의 물리적 파괴에 의해 수집된다. 예를 들어, 태반, 또는 이의 일부분을 예를 들어 압착하거나, 베어내거나, 다지거나, 주사위꼴로 자르거나, 잘게 자르거나, 침연시킬 수 있다. 그 후, 조직을 배양하여 단리된 태반 세포의 집단을 수득한다. 전형적으로, 태반 세포 수집 조성물을 사용하여, 예를 들어 그 중에서 태반 조직을 파괴한다 (섹션 5.2 및 하기 참조).
- [0193] 물리적 파괴 및/또는 효소에 의한 소화 및 줄기 세포 회수 전에 태반이 구성요소들로 해부될 수 있다. 태반 줄기 세포는 전체 태반으로부터를 포함하여, 양막, 융모막, 제대, 태반엽, 또는 이들의 임의의 조합물의 전체 또는 일부분으로부터 수득될 수 있다. 바람직하게는, 단리된 태반 세포는 양막 및 융모막을 포함하는 태반 조직으로부터 수득된다. 전형적으로, 단리된 태반 세포는 태반 조직의 소형 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 덩어리의 파괴에 의해 수득될 수 있다. 임의의 물리적 파괴 방법이 사용될 수 있고, 단 파괴 방법은, 예를 들어, 트리판 블루 배제에 의해 결정되는 바와 같이, 상기 기관 내의 세포의 다수, 더욱 바람직하게는 대다수, 더욱 바람직하게는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%이 생존성 있도록 한다.
- [0194] 일반적으로, 줄기 세포는 태반 또는 이의 일부분으로부터 만출 후 처음 약 3일 이내의 임의의 시간에 수집될 수 있지만, 바람직하게는 만출 후 약 8시간 내지 약 18시간 사이에 수집된다.
- [0195] 구체적 실시양태에서, 파괴된 조직이 단리된 태반 세포의 증식에 적절한 조직 배양 배지에서 배양된다 (예를 들어, 태반 줄기 세포의 배양이 기술된 하기의 섹션 5.5 참조).
- [0196] 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반은 하나 이상의 조직 소화 효소를 사용함으로써 달성될 수 있는 효소에 의한 소화를 포함하는 태반 조직의 물리적 파괴에 의해 수집된다. 또한 태반, 또는 이의 일부분이 물리적인

로 파괴되고 하나 이상의 효소로 소화된 후, 생성된 물질이 세포 수집 조성물에 함침되거나, 이러한 조성물 내로 혼합될 수 있다.

[0197] 바람직한 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직 파괴성 효소(들)를 포함한다. 효소에 의한 소화는 바람직하게는 효소의 조합물, 예를 들어 매트릭스 메탈로프로테아제 및 중성 프로테아제의 조합물, 예를 들어 콜라게나제 및 디스파제의 조합물을 사용한다. 한 실시양태에서, 태반 조직의 효소에 의한 소화는 히알루론산의 소화를 위해 매트릭스 메탈로프로테아제, 중성 프로테아제, 및 점액용해 효소의 조합물, 예컨대 콜라게나제, 디스파제, 및 히알루로니다제의 조합물, 또는 리베라제 (보링거 만하임 코퍼레이션(Boehringer Mannheim Corp.), 인디애나주 인디애나폴리스) 및 히알루로니다제의 조합물을 사용한다. 태반 조직을 파괴하는데 사용될 수 있는 다른 효소에는 파파인, 테옥시리보뉴클레아제, 세린 프로테아제, 예컨대 트립신, 키모트립신, 또는 엘라스타제가 포함된다. 세린 프로테아제는 혈청 내의 알파 2 마이크로글로불린에 의해 억제될 수 있고, 따라서 소화에 사용된 배지는 일반적으로 혈청이 없다. 세포 회수 효율을 증가시키기 위해 EDTA 및 DNase가 효소 소화 절차에서 통상적으로 사용된다. 점성 소화물 내에 세포가 포획되는 것을 방지하도록 바람직하게는 소화물이 희석된다.

[0198] 조직 소화 효소의 임의의 조합물이 사용될 수 있다. 효소를 사용하는 조직 소화에 대한 전형적인 농도에는 예를 들어 콜라게나제 I 및 콜라게나제 IV의 경우 50-200 U/mL, 디스파제의 경우 1-10 U/mL, 및 엘라스타제의 경우 10-100 U/mL가 포함된다. 프로테아제는 조합되어, 즉 2가지 이상의 프로테아제가 동일한 소화 반응에서 사용될 수 있거나, 또는 태반 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포 및 태반 다능성 세포를 유리시키기 위해 순차적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 태반 또는 이의 일부분이 먼저 약 1 내지 약 2 mg/ml의 적절한 양의 콜라게나제 I로 예를 들어 30분 동안 소화된 후, 약 0.25% 농도의 트립신으로 예를 들어 10분 동안 37 °C에서 소화된다. 바람직하게는 세린 프로테아제는 다른 효소의 사용 후에 이어서 사용된다.

[0199] 또 다른 실시양태에서, 태반 세포 수집 조성물, 또는 태반 세포 수집 조성물로 태반 세포를 분리하기 전의 조직이 파괴 및/또는 소화되어 있는 용액에 킬레이트제, 예를 들어, 에틸렌 글리콜 비스(2-아미노에틸에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)을 첨가함으로써 조직이 추가로 파괴될 수 있다.

[0200] 소화 후, 소화물을 배양 배지로 예를 들어 3회 세정하고, 세정된 세포를 배양 플라스크 내로 파종한다. 그 후, 세포를 차등 부착에 의해 분리하고, 예를 들어, 생존율, 세포 표면 마커, 분화 등에 대해 특성화한다.

[0201] 전체 태반, 또는 태아 및 모체 세포 모두를 포함하는 태반의 일부분의 경우 (예를 들어, 태반의 일부분이 융모막 또는 태반엽을 함유하는 경우), 수집된 태반 세포는 태아 및 모체 양쪽에서 유래된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포의 혼합물을 포함할 것임이 이해될 것이다. 모체 세포를 포함하지 않거나 무시할 수 있는 개수의 모체 세포를 포함하는 태반의 일부분 (예를 들어, 양막)의 경우, 수집된 태반 세포는 거의 배타적으로 태아 태반 세포, 예를 들어 태아 태반 줄기 세포 또는 태아 태반 다능성 세포를 포함할 것이다.

[0202] 차등 트립신처리 (하기 섹션 섹션 5.4.5 참조)에 이어서, 1개 이상의 새로운 배양 컨테이너에서 신선한 증식 배지에서 배양하는 것 (임의적으로 2차 차등 트립신처리 단계가 이어짐)에 의해 태반 세포가 파괴된 조직으로부터 분리될 수 있다.

[0203] 5.4.4 태반 관류

[0204] 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포유동물 태반의 관류에 의해 또한 획득할 수 있다. 포유동물 태반을 관류하여 태반 세포를 획득하는 방법이, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,045,148 및 7,255,729 (Hariri), 및 관련 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0190042에 개시되어 있고, 이들 각각의 개시내용은 그 전문이 본원에 포함된다.

[0205] 관류 용액으로 세포 수집 조성물을 예를 들어 사용하여, 예를 들어, 태반 혈관을 통과하는 관류에 의해, 태반 세포를 수집할 수 있다. 한 실시양태에서, 제대 동맥과 제대 정맥 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 관류 용액을 통과 시킴으로써 포유동물 태반이 관류된다. 태반을 통과하는 관류 용액의 흐름은 태반 내로의 중력 흐름을 예를 들어 사용하여 달성될 수 있다. 바람직하게는, 관류 용액을 펌프, 예를 들어, 연동(peristaltic) 펌프를 사용하여 태반을 통과하도록 밀어 넣는다. 예를 들어, 무균성 연결 기구, 예컨대 무균성 튜빙(tubing)에 연결된 캐놀러, 예를 들어, 테플론(TEFLON®) 또는 플라스틱 캐놀러가 제대 정맥에 삽관될 수 있다. 무균성 연결 기구는 관류 매니폴드(manifold)에 연결된다.

[0206] 관류에 대비하여, 바람직하게는 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥이 태반의 최고점에 위치하는 방식으로 놓인다

(예를 들어, 매달린다). 태반 혈관계 및 주변 조직에 관류 유체를 통과시킴으로써 태반이 관류될 수 있다. 관류 유체를 제대 정맥에 통과시키고 제대 동맥으로부터 수집함으로써, 또는 관류 유체를 제대 동맥에 통과시키고 제대 정맥으로부터 수집함으로써, 태반이 또한 관류될 수 있다.

[0207] 예를 들어, 한 실시양태에서, 예를 들어, 가요성 연결부를 통해 관류 용액의 저장소에 연결된 피펫에, 제대 동맥 및 제대 정맥이 동시에 연결된다. 관류 용액이 제대 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액이 태반의 주변 조직 내로 혈관의 벽으로부터 삼출되고/되거나 이러한 벽을 통과하고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적절한 개방형 용기에 수집된다. 또한 관류 용액이 제대 개구부를 통해 도입되어, 모체의 자궁 벽과 계면한 태반의 벽 내의 개구부에서 흘러 나오거나 스며나오게 될 수 있다. "팬(pan)" 방법으로 칭해질 수 있는 이러한 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

[0208] 또 다른 실시양태에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하여 제대 동맥으로부터 수집되거나, 또는 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로(closed circuit)" 방법으로 칭해질 수 있는 이러한 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 배타적으로 태아 세포이다.

[0209] 팬 방법을 사용하는 관류, 즉 관류액이 태반의 모체 측면으로부터 삼출된 후 수집되는 관류로 태아 및 모체 세포의 혼합물이 생성된다는 것이 이해될 것이다. 그 결과, 이러한 방법에 의해 수집된 세포는 태아 및 모체 기원 양쪽 모두의 태반 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포의 혼합 집단을 포함한다. 반면에, 관류 유체가 1개 또는 2개의 태반 혈관을 통과하고 오직 나머지 혈관(들)만을 통하여 수집되는, 태반 혈관 계만을 통과한 폐쇄 회로 방법의 관류로는 거의 배타적으로 태아 기원의 태반 세포의 집단이 수집된다.

[0210] 한 실시양태에서, 폐쇄 회로 관류 방법이 하기와 같이 수행될 수 있다. 산후 태반을 출산 후 약 48시간 이내에 수득한다. 제대를 집게로 잡고, 집게 위로 절단한다. 제대는 폐기할 수 있거나, 또는 제대 줄기 세포를 예를 들어 회수하기 위해 및/또는 생체재료의 생산을 위해 제대막을 프로세싱하기 위해 프로세싱할 수 있다. 양막은 관류 동안 유지될 수 있거나, 또는, 예를 들어, 손가락으로의 비절개 박리를 사용하여, 용모막으로부터 분리될 수 있다. 양막이 관류 전에 용모막으로부터 분리되는 경우, 이는 예를 들어 폐기될 수 있거나 또는 프로세싱될 수 있고, 예를 들어, 효소에 의한 소화에 의해 태반 세포를 수득하기 위해, 또는 양막 생체재료, 예를 들어, 미국 출원 공개 번호 2004/0048796에 기술된 생체재료를 예를 들어 생산하기 위해, 프로세싱될 수 있다. 모든 가시성 혈병 및 잔류 혈액을, 예를 들어, 무균성 거즈를 사용하여, 태반에서 청소한 후, 예를 들어, 제대막을 부분적으로 절단하여 제대의 단면을 노출시킴으로써, 제대 혈관을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들어, 단힌 악어입 집계를 각각의 혈관의 절단 끝부분을 통해 전진시킴으로써, 개방시킨다. 이어서, 관류 기구 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 튜빙과 같은 장치를 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적절한 임의의 펌프, 예를 들어, 연동 펌프일 수 있다. 그 후, 무균성 수집 저장소, 예를 들어, 250 ml 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입한다. 대안적으로, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥 내로 삽입하고, 수집 저장소(들)에 대한 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 양쪽 모두에 삽입한다. 그 후, 태반에 다량의 관류 용액, 예를 들어, 약 750 ml의 관류 용액을 관류한다. 그 후 관류액 내의 세포를, 예를 들어, 원심분리에 의해, 수집한다.

[0211] 또 다른 실시양태에서, 예를 들어 태반 관류액 세포를 수집하기 위한 관류는 다음과 같이 수행한다. 태반 혈액을 함유하는 태반(들)을 예를 들어 연동 펌프를 사용하여 멸균 0.9% NaCl (예를 들어, 약 750 mL)을 펌핑함으로써 태반 혈관계만을 통해 관류시키고, 생성된 관류액을 수집 백에 수집한다. 관류액으로부터의 세포를 예를 들어 약 420 g에서 원심분리에 의해 수집한 후, 과량의 상청액 (NaCl, 혈장, 항응고제)을 제거한다. 이어서, 헤타스타치를 관류액 세포에 첨가하여, 30% 희석액을 수득한다. 이어서, 관류액 세포를 혈장 추출기에 예를 들어 약 1 시간 동안 넣어서, 적혈구를 분리한다. 생성된 혈장 및 유핵 세포를 수집 백으로부터 분리하여, 혈장 추출기에 다시 넣는다. 나머지 세포를 5% 인간 혈청 알부민에 약 20 mL의 최종 부피로 재현탁시킨다. 사전 혼합한 DMSO/플라즈마라이트 A(PLASMALYTE A®) (1:1 v/v)를 첨가하여, 약 24 mL의 부피를 수득한다. 생성된 세포를 동결보존시킨다. 상기 방법의 특정 실시양태에서, 관류액이 수득되는 태반은, 태반 세포를 수집하기 위해 관류시키기 전에, 제대혈이 배출되지만 관류되지는 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 관류액이 수득되는 태반은, 태반 세포를 수집하기 위해 관류시키기 전에, 제대혈이 배출되고, 잔류 혈액을 제거하도록 관류된다.

[0212] 한 실시양태에서, 근위부 제대를 관류 동안 집게로 잡고, 더욱 바람직하게는 태반 원반 내로의 제대의 삽입부의 4-5 cm 이내에서 집게로 잡는다.

[0213] 태반 세포를 수집하는데 사용된 관류 액체의 부피는 수집되는 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반에서 이루어질

수집 횟수 등에 따라 변할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 관류 액체의 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 ml일 수 있다. 전형적으로, 태반이 방혈 후 700-800 ml의 관류 액체로 관류된다.

[0214] 태반을 수 시간 또는 수 일에 걸쳐 여러 번 관류할 수 있다. 태반이 여러 번 관류되는 경우, 태반이 컨테이너 또는 기타 적절한 용기에서 무균 조건 하에 유지 또는 배양될 수 있고, 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와파린 소듐, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)이 있거나 없고, 또한 항미생물제 (예를 들어, β -메르캅토에탄올 (0.1 mM); 항생제, 예컨대 스트렙토마이신 (예를 들어, 40-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 페니실린 (예를 들어, 40 U/ml), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 있거나 없는 표준 관류 용액 (예를 들어, 인산염 완충 염수 ("PBS")와 같은 생리식염수) 또는 세포 수집 조성물로 관류될 수 있다. 한 실시양태에서, 관류 및 관류액의 수집 전에 태반이 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 또는 24시간, 또는 2일 또는 3일 또는 그 이상 동안 유지 또는 배양되도록, 단리된 태반을 관류액을 수집하지 않으면서 일정 기간 동안 유지 또는 배양한다. 관류된 태반은 1회 이상의 추가적인 시간(들) 동안, 예를 들어 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 또는 24시간, 또는 그 이상 동안 유지된 후, 예를 들어 700-800 ml의 관류 유체로 2번째로 관류될 수 있다. 태반은 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 또는 그 이상으로 관류될 수 있고, 예를 들어, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 또는 6시간마다 관류될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어, 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 유핵 세포의 개수가 100개의 세포/ml 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 상이한 시점의 관류액들을 개별적으로 추가로 프로세싱하여, 시간-의존적인 세포, 예를 들어, 줄기 세포의 집단을 회수할 수 있다. 상이한 시점으로부터의 관류액들을 또한 풀링(pooling)할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 만출 후 약 8시간 내지 약 18시간 사이에 줄기 세포가 한번에 또는 여러 번 수집된다.

[0215] 바람직하게는, 상기 용액으로 관류되지 않았고, 태반 세포를 수득하도록 다른 방식 (예를 들어, 조직 파괴, 예를 들어 효소에 의한 소화)으로 처리되지도 않은 포유동물 태반으로부터 수득가능한 개수보다 유의하게 더 많은 태반 세포가 관류로 수집된다. 이러한 상황에서, "유의하게 더 많은"은 10% 이상 더 많은 것을 의미한다. 예를 들어, 태반 또는 이의 일부분이 배양된 배양 배지로부터 수득가능한 태반 줄기 세포의 개수보다 유의하게 더 많은 태반 세포가 관류로 산출된다.

[0216] 하나 이상의 프로테아제 또는 기타 조직 파괴성 효소를 포함하는 용액으로의 관류에 의해 태반으로부터 태반 세포가 단리될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 태반 또는 이의 일부분 (예를 들어 양막, 양막 및 융모막, 태반 소엽 또는 태반엽, 체대, 또는 임의의 상기의 것들의 조합)을 25-37°C로 만들고, 하나 이상의 조직 파괴성 효소와 함께 200 ml의 배양 배지에서 30 분 동안 인큐베이션한다. 관류액으로부터의 세포를 수집하고, 4°C로 만들고, 5 mM EDTA, 2 mM 디티오트레이톨 및 2 mM 베타-메르캅토에탄올을 포함하는 저온 억제제 혼합물로 세정한다. 수 분 후 태반 세포를 저온 (예를 들어 4°C)의 줄기 세포 수집 조성물로 세정한다.

[0217] 5.4.5 태반 줄기 세포의 단리, 분류, 및 특성화

[0218] 관류에 의해 또는 물리적 파괴, 예를 들어 효소에 의한 소화에 의해 수득되었는지 여부와 관계 없이, 단리된 태반 세포, 예를 들어, 상기 섹션 5.3에 기술된 세포를 먼저 피콜(Ficoll) 농도구배 원심분리에 의해 다른 세포로부터 정제 (즉, 단리)할 수 있다. 이같은 원심분리는 원심분리 속도 등에 대해 임의의 표준 프로토콜을 따를 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 태반으로부터 수집된 세포가 실온에서 15분 동안의 5000×g의 원심분리에 의해 관류액으로부터 회수되고, 이는 세포를 예를 들어 오염성 잔해물 및 혈소판으로부터 분리한다. 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액을 약 200 ml로 농축하고, 부드럽게 피콜 상에 층상화하고, 22°C에서 20분 동안 약 1100×g로 원심분리하여, 세포의 저밀도 계면층을 추가적인 프로세싱을 위해 수집한다.

[0219] 세포 펠렛이 신선한 줄기 세포 수집 조성물, 또는 줄기 세포 유지에 적절한 배지, 예를 들어, 2 U/ml 헤파린 및 2 mM EDTA (GibcoBRL, NY)를 함유하는 IMDM 무혈청 배지에 재현탁될 수 있다. 예를 들어, 제조업자의 권장 절차에 따라 림포프렘(Lymphoprep) (니코메드 파마(Nycomed Pharma), 노르웨이 오슬로)를 사용하여, 전체 단핵 세포 분획을 단리할 수 있다.

[0220] 관류 또는 소화에 의해 수득된 태반 세포를, 예를 들어, 추가로 또는 처음에, 0.2% EDTA를 함유한 0.05% 트립신 용액 (시그마, 미주리주 세인트 루이스)을 예를 들어 사용하는 차등 트립신처리에 의해 단리할 수 있다. 단리된 태반 세포는 플라스틱 표면으로부터 약 5분 이내에 전형적으로 탈착되는 반면, 기타 부착성 집단은 20-

30분을 초과하는 인큐베이션을 전형적으로 필요로 하기 때문에 차등 트립신처리가 가능하다. 트립신처리 및 트립신 중화 (예를 들어, 트립신 중화 용액 (TNS, Cambrex) 등을 이용) 후에, 탈착된 태반 세포를 수확할 수 있다. 부착성 세포를 분리하는 한 실시양태에서, 예를 들어 약 $5-10 \times 10^6$ 개 세포의 분취량을 여러 T-75 플라스크, 바람직하게는 피브로넥틴이 코팅된 T-75 플라스크 각각에 담는다. 이같은 실시양태에서, 세포를 시판되는 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM) (Cambrex)와 함께 배양하고, 조직 배양 인큐베이터 (37°C, 5% CO₂) 내에 놓을 수 있다. 10-15일 후, PBS로 세정함으로써 비-부착성 세포가 플라스크로부터 제거된다. 그 후, PBS를 MSCGM으로 교체한다. 바람직하게는 플라스크를 각종 부착성 세포 유형의 존재에 대해, 특히 섬유모세포 모양 세포의 클러스터의 확인 및 확장에 대해 매일 검사한다.

[0221] 예를 들어, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하는 세포 형태학의 검사에 의해, 유세포 분석법, 세포 분류, 면역세포화학 (예를 들어, 조직 특이적 또는 세포 마커 특이적 항체로의 염색), 형광 활성화 세포 분류 (FACS), 자기 활성화 세포 분류 (MACS)와 같은 표준 세포 검출 기술을 사용하여 형태학 및 세포 표면 마커에서의 변화를 측정함으로써, 및/또는 당업계에서 주지된 기술, 예컨대 PCR 및 유전자 발현 프로파일링을 사용하여 유전자 발현에서의 변화를 측정함으로써, 포유동물 태반에서 수집된 세포의 개수 및 유형을 모니터링할 수 있다. 이러한 기술들은 하나 이상의 특정 마커에 대해 양성인 세포들을 확인하는데 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, CD34에 대한 항체를 사용하여, 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는지 여부를 상기의 기술을 사용하여 결정할 수 있다; 세포가 검출가능한 양의 CD34를 포함하는 경우, 세포는 CD34⁺이다. 마찬가지로, RT-PCR에 의해 검출될 수 있기에 충분한 OCT-4 RNA 또는 성인 세포보다 유의하게 더 많은 OCT-4 RNA를 세포가 생산하는 경우, 세포는 OCT-4⁺이다. 세포 표면 마커 (예를 들어, CD34와 같은 CD 마커)에 대한 항체, 및 OCT-4와 같은 줄기 세포-특이적 유전자의 서열이 당업계에 주지되어 있다.

[0222] 태반 세포, 특히 피콜 분리, 차등 부착 또는 이들의 조합에 의해 분리된 세포를 형광 활성화 세포 분류기 (FACS)를 사용하여 분류할 수 있다. 형광 활성화 세포 분류 (FACS)는 입자의 형광 성질을 기초로 하는, 세포가 포함되는 입자를 분리하기 위한 주지된 방법이다 (문헌 [Kamarch, 1987, Methods Enzymol, 151:150-165]). 개별적인 입자들 내의 형광 모이어티의 레이저 여기로 작은 전하가 발생하여, 혼합물로부터 양성 입자와 음성 입자가 전자기적으로 분리되도록 한다. 한 실시양태에서, 세포 표면 마커-특이적 항체 또는 리간드가 상이한 형광 표지로 표지된다. 세포가 세포 분류기를 통해 프로세싱되어, 사용된 항체에 결합하는 능력을 기초로 세포가 분리된다. FACS로 분류된 입자들이 96-웰 또는 384-웰 플레이트의 개별적인 웰 내로 직접 침착되어, 분리 및 클로닝을 용이하게 할 수 있다.

[0223] 한 세포 분류 계획에서, 태반으로부터의 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 및 태반 다능성 세포가, 예를 들어 마커 CD34, CD38, CD44, CD45, CD73, CD105, OCT-4 및/또는 HLA-G의 발현을 기초로 분류된다. 이는 배양 시의 세포의 부착 성질을 기초로 줄기 세포를 선별하는 절차와 함께 이루어질 수 있다. 예를 들어, 부착 선별 줄기가 마커 발현을 기초로 하는 분류 전 또는 후에 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 먼저 세포가 CD34의 발현을 기초로 분류된다; CD34⁻ 세포가 유지되고, CD200⁺HLA-G⁺인 세포가 모든 다른 CD34⁻ 세포로부터 분리된다. 또 다른 실시양태에서, 태반으로부터의 세포가 마커 CD200 및/또는 HLA-G의 발현을 기초로 분류된다; 예를 들어, 이러한 마커들 중 하나를 디스플레이하는 세포가 추가적인 사용을 위해 분리된다. 구체적인 실시양태에서, CD200 및/또는 HLA-G를 예를 들어 발현하는 세포가 CD73 및/또는 CD105의 발현, 또는 항체 SH2, SH3 또는 SH4가 인식하는 에피토프의 발현, 또는 CD34, CD38 또는 CD45의 발현 결여를 기초로 추가로 분류될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 태반 세포가 CD200, HLA-G, CD73, CD105, CD34, CD38 및 CD45의 발현 또는 발현 결여에 의해 분류되고, CD200⁺, HLA-G⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD38⁻ 및 CD45⁻인 태반 세포가 추가적인 사용을 위해 다른 태반 세포들로부터 분리된다.

[0224] 태반 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포의 항체-매개 검출 및 분류와 관련하여, 특정 마커에 대해 특이적인 임의의 항체를 세포의 검출 및 분류 (예를 들어, 형광-활성화 세포 분류)에 적절한 임의의 형광단 또는 기타 표지와 조합하여 사용할 수 있다. 특정 마커에 대한 항체/형광단 조합물에는 HLA-G (Serotec (Raleigh, North Carolina)으로부터 입수가 가능), CD10 (BD Immunocytometry Systems (San Jose, California)로부터 입수가 가능), CD44 (BD Biosciences Pharmingen (San Jose, California)으로부터 입수가 가능), 및 CD105 (R&D Systems Inc. (Minneapolis, Minnesota)로부터 입수가 가능)에 대한 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 접합 모노클로날 항체; CD44, CD200, CD117, 및 CD13에 대한 피코에리트린 (PE) 접합 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); CD33 및 CD10에 대한 피코에리트린-Cy7 (PE Cy7) 접합 모노클로날 항체 (BD

Biosciences Pharmingen); 알로피코시아닌 (APC) 접합 스트렙타비딘 및 CD38에 대한 모노클로날 항체 (BD Biosciences Pharmingen); 및 비오틴화 CD90 (BD Biosciences Pharmingen)이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 기타 항체에는 CD133-APC (Miltenyi), KDR-비오틴 (CD309, Abcam), 사이토케라틴 K-FITC (Sigma 또는 Dako), HLA ABC-FITC (BD), HLA DR,DQ,DP-PE (BD), β -2-마이크로글로불린-PE (BD), CD80-PE (BD) 및 CD86-APC (BD)가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0225] 사용될 수 있는 기타 항체/표지 조합물에는 CD45-PerCP (페리딘 클로로필 단백질); CD44-PE; CD19-PE; CD10-F (플루오레세인); HLA-G-F 및 7-아미노-악티노마이신-D (7-AAD); HLA-ABC-F 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0226] 본원에서 제공된 단리된 태반 세포를 피코에리트린-Cy5 (PE Cy5) 접합 스트렙타비딘 및 CD117 또는 CD133에 대한 비오틴 접합 모노클로날 항체를 예를 들어 사용하여 CD117 또는 CD133에 대해 평가할 수 있다; 그러나, 이러한 시스템을 사용하면, 세포는 비교적 높은 배경값으로 인해 각각 CD117 또는 CD133에 대하여 양성으로 나타날 수 있다.

[0227] 본원에 기재된 단리된 태반 세포가 단일 마커에 대한 항체로 표지되어, 검출 및 분류될 수 있다. 또한 태반 세포가 상이한 마커들에 대한 여러 항체로 동시에 표지될 수 있다.

[0228] 또 다른 실시양태에서, 자기 비드를 사용하여 세포를 분리할 수 있다. 자기 비드 (직경 0.5-100 μ m)에 결합하는 능력을 기초로 입자를 분류하는 방법인 자기 활성화 세포 분류 (MACS)를 사용하여 세포들을 분류할 수 있다. 특정 세포 표면 분자 또는 합텐(hapten)을 특이적으로 인식하는 항체를 공유 결합으로 부가하는 것을 포함하여, 다양한 유용한 변형을 자기 미세구에 수행할 수 있다. 그 후, 비드가 세포와 혼합되어 결합이 허용된다. 그 후, 세포를 자기장에 통과시켜, 특정 세포 표면 마커가 있는 세포를 분리해 낸다. 한 실시양태에서, 이어서 이러한 세포들을 단리하고, 추가적인 세포 표면 마커에 대한 항체에 커플링된 자기 비드와 다시 혼합한다. 세포를 자기장에 다시 통과시켜, 양쪽 항체에 결합한 세포를 단리한다. 그 후, 이같은 세포를 별도의 접시, 예컨대 클론성 단리를 위한 미량역가 접시 내로 회석할 수 있다.

[0229] 단리된 태반 세포를 세포 형태학 및 성장 특성을 기초로 또한 특성화 및/또는 분류할 수 있다. 예를 들면, 단리된 태반 세포가, 예를 들어, 배양 시 섬유모세포 모양의 외관을 갖는 것으로 특성화되고/되거나 이러한 외관을 기초로 선별될 수 있다. 또한 단리된 태반 세포는 배아-유사체를 형성하는 능력이 있는 것으로 특성화되고/되거나 이러한 능력을 기초로 선별될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 섬유모세포 모양의 형상이고, CD73 및 CD105를 발현하며, 배양시 하나 이상의 배아-유사체를 형성하는 단리된 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, 배양시 하나 이상의 배아-유사체를 생산하는 OCT-4⁺ 태반 세포가 다른 태반 세포로부터 단리된다.

[0230] 또 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포가 콜로니 형성 단위 분석법에 의해 확인 및 특성화될 수 있다. 콜로니 형성 단위 분석법은 MESENCULT™ 배지 (Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver British Columbia))와 같이 당업계에서 통상적으로 공지되어 있다.

[0231] 단리된 태반 세포를 생존율, 증식 잠재력 및 수명에 대해 당업계에서 공지된 표준 기술, 예컨대 트리판 블루 배제 분석법, 플루오레세인 디아세테이트 흡수 분석법, 요오드화프로피듐 흡수 분석법 (생존율 평가용); 및 티미딘 흡수 분석법, MTT 세포 증식 분석법 (증식 평가용)을 사용하여 평가할 수 있다. 당업계에서 주지된 방법에 의해, 예컨대 확장 배양 시 개체수 배가의 최대값을 결정함으로써, 수명을 결정할 수 있다.

[0232] 단리된 태반 세포가 당업계에서 공지된 기타 기술, 예를 들어, 원하는 세포의 선택적 성장 (양성 선별), 원치 않는 세포의 선택적 파괴 (음성 선별); 예를 들어 대두 응집소와의 혼합 집단 내에서의 차별적인 세포 응집성을 기초로 하는 분리; 동결-해동 절차; 여과; 통상적 및 구역 원심분리; 원심분리성 정화 (카운터-스트리밍 (counter-streaming) 원심분리); 단위 중량 분리; 역류(countercurrent) 분배; 전기 영동 등을 사용하여 다른 태반 세포로부터 또한 단리될 수 있다.

[0233] **5.5 단리된 태반 세포의 배양**

[0234] **5.5.1 배양 배지**

[0235] 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단, 또는 태반 줄기 세포가 성장해 나오는 세포 또는 태반 조직을 사용하여 세포 배양을 시작하거나 파종할 수 있다. 일반적으로 세포는 세포외 매트릭스 또는 리간드, 예컨대 라미닌, 콜라겐 (예를 들어, 천연 또는 변성), 젤라틴, 피브로넥틴, 오르니틴, 비트로넥틴, 및 세포외 막 단

백질 (예를 들어, 매트릭젤®, 비디 디스커버리 랩웨어, 메사추세츠주 베드포드)로 코팅되거나 코팅되지 않은 무균성 조직 배양 용기로 옮겨진다.

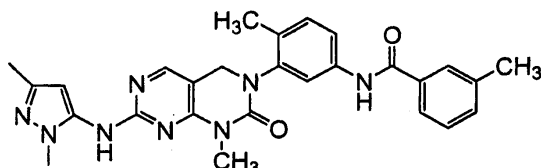
[0236] 단리된 태반 세포는 당업계에서 세포, 예를 들어, 줄기 세포의 배양에 허용가능한 것으로 인식되는 임의의 배지 및 임의의 조건에서 배양될 수 있다. 바람직하게는, 배양 배지는 혈청을 포함한다. 단리된 태반 세포는, 예를 들어, ITS (인슐린-트랜스페린-셀레늄), LA+BSA (리놀레산-소 혈청 알부민), 텍스트로스, L-아스코르브산, PDGF, EGF, IGF-1, 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM-LG (둘베코(Dulbecco) 변형 필수 배지, 저-글루코스)/MCDB 201 (병아리 섬유모세포 기초 배지); 1% 내지 20% 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 DMEM-HG (고-글루코스); 15% FBS를 포함하는 DMEM-HG; 10% FBS, 10% 말 혈청, 및 하이드로코르티손을 포함하는 IMDM (이스코브(Iscove) 변형 둘베코 배지); 10% FBS, EGF, 및 헤파린을 포함하는 M199; 10% FBS, 글루타맥스 (GLUTAMAX)TM 및 젠타마이신을 포함하는 α -MEM (최소 필수 배지); 10% FBS, 글루타맥스TM 및 젠타마이신을 포함하는 DMEM 등에서 배양될 수 있다.

[0237] 태반 세포를 배양하는데 사용될 수 있는 기타 배지에는 DMEM (고 또는 저 글루코스), 이글 기초 배지, 햄 F10 배지 (F10), 햄 F-12 배지 (F12), 이스코브 변형 둘베코 배지, 중간엽 줄기 세포 성장 배지 (MSCGM), 라이보비츠(Liebovitz) L-15 배지, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, 개량 DMEM (김코), DMEM/MCDB201 (시그마), 및 CELL-GRO FREE가 포함된다.

[0238] 배양 배지에 혈청 (예를 들어, 소 태아 혈청 (FBS), 바람직하게는 약 2-15% (v/v); 말 혈청 (ES); 인간 혈청 (HS)); 베타-메르캅토에탄올 (BME), 바람직하게는 약 0.001% (v/v); 하나 이상의 성장 인자, 예를 들어, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 표피 성장 인자 (EGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 인슐린-유사 성장 인자-1 (IGF-1), 백혈병 억제 인자 (LIF), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 및 에리트로포이에틴 (EPO); L-발린 포함되는 아미노산; 및 미생물 오염을 제어하기 위한 하나 이상의 항생제 및/또는 항진균제, 예를 들어, 페니실린 G, 스트렙토마이신 술페이트, 암포테리신 B, 젠타마이신, 및 니스타틴이 예를 들어 포함되는 하나 이상의 성분이 단독으로 또는 조합되어 보충될 수 있다.

[0239] 단리된 태반 세포는 표준 조직 배양 조건에서, 예를 들어, 조직 배양 접시 또는 멀티웰 플레이트에서 배양될 수 있다. 현적(hanging drop) 방법을 사용하여 단리된 태반 세포가 또한 배양될 수 있다. 이러한 방법에서, 단리된 태반 세포가 약 5 ml의 배지 내에 약 1×10^4 개의 세포/ml로 현탁되고, 1개 이상의 배지 액적이 조직 배양 컨테이너, 예를 들어, 100 ml 페트리(Petri) 접시의 뚜껑의 내부에 놓인다. 액적은, 예를 들어, 단일 액적이거나, 또는 다수의 액적일 수 있다 (예를 들어, 멀티채널 피펫터(multichannel pipetter)로부터). 뚜껑을 조심스럽게 뒤집고, 다량의 액체, 예를 들어, 접시 대기 내의 수분 함량을 유지하는데 충분한 무균성 PBS를 함유하는 접시 바닥 위에 놓고, 줄기 세포를 배양한다.

[0240] 한 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 단리된 태반 세포에서 미분화 표현형을 유지하는 작용을 하는 화합물의 존재 하에 배양된다. 구체적 실시양태에서, 이러한 화합물은 치환된 3,4-디하이드로피리디놀[4,5-d]피리미딘이다. 더욱 구체적 실시양태에서, 화합물은 하기 화학 구조의 화합물이다:



[0241] 이러한 화합물은 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단과, 예를 들어 약 1 μ M 내지 약 10 μ M 사이의 농도로 접촉될 수 있다.

[0242] 5.5.2 태반 세포의 확장 및 증식

[0244] 일단 단리된 태반 세포, 또는 단리된 태반 세포의 집단 (예를 들어, 생체 내에서 줄기 세포 또는 줄기 세포의 집단과 정상적으로 회합되는 태반 세포의 50% 이상으로부터 분리된 태반 세포 또는 태반 세포의 집단)이 수득되면, 이러한 세포 또는 세포의 집단이 시험관 내에서 증식 및 확장될 수 있다. 예를 들어, 단리된 태반 세포의 집단이 조직 배양 컨테이너, 예를 들어, 접시, 플라스크, 멀티웰 플레이트 등에서, 세포가 70-90% 전면성장으로 증식하는데 충분한 시간 동안, 즉 세포 및 이의 자손이 조직 배양 컨테이너의 배양 표면적의 70-90%를 차지할 때까지 배양될 수 있다.

[0245] 단리된 태반 세포가 세포 성장을 허용하는 밀도로 배양 용기에 파종될 수 있다. 예를 들어, 세포는 저밀도 (예를 들어, 약 1,000개 내지 약 5,000개의 세포/cm²) 내지 고밀도 (예를 들어, 약 50,000개 이상의 세포/cm²)로 파종될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 공기 중 약 0 내지 약 5 부피%의 CO₂ 존재 하에 배양된다. 일부 바람직한 실시양태에서, 세포는 공기 중 약 2 내지 약 25%의 O₂, 바람직하게는 공기 중 약 5 내지 약 20%의 O₂에서 배양된다. 바람직하게는 세포는 약 25°C 내지 약 40°C, 바람직하게는 37°C에서 배양된다. 바람직하게는 세포는 인큐베이터에서 배양된다. 배양 배지는 정적일 수 있거나, 또는 생물반응기를 예를 들어 사용하여 진탕될 수 있다. 바람직하게는, 태반 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포는 낮은 산화성 스트레스 하에 성장된다 (예를 들어, 글루타티온, 아스코르브산, 카탈라제, 토코페롤, N-아세틸시스테인 등이 첨가됨).

[0246] 일단 약 100% 미만, 예를 들어, 70%-90% 전면성장이 수득되면, 세포가 계대될 수 있다. 예를 들어, 세포를 당업계에 주지된 기술을 사용하여 효소로 처리하여, 예를 들어 트립신처리하여, 조직 배양 표면으로부터 세포를 분리할 수 있다. 세포를 피펫팅에 의해 제거하고 세포를 계수한 후, 약 10,000-100,000개 세포/cm², 바람직하게는 약 50,000개 세포/cm²가 신선한 배양 배지를 함유하는 새로운 배양 컨테이너로 계대된다. 전형적으로, 새로운 배지는 단리된 태반 세포가 제거된 배지와 동일한 유형이다. 단리된 태반 세포는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회 또는 20회, 또는 그 이상 계대될 수 있다.

[0247] **태반 세포 은행의 생산**

[0248] 산후 태반으로부터의 단리된 세포, 예를 들어 상기 섹션 5.3에 기술된 단리된 태반 세포를 다수의 상이한 방식으로 배양하여, 단리된 태반 세포들의 로트(lot) 세트, 예를 들어 개별적으로 투여가능한 용량들의 세트를 생산할 수 있다. 이같은 로트는, 예를 들어, 태반 관류액으로부터 또는 효소로 소화 태반 조직으로부터의 세포로부터 수득할 수 있다. 다수의 태반으로부터 수득된, 태반 세포들의 로트 세트가, 예를 들어, 장기 보관을 위해 단리된 태반 세포들의 은행에 배열될 수 있다. 일반적으로, 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포가 태반 물질의 초기 배양물로부터 수득되어 종자 배양물을 형성하고, 이는 제어된 조건 하에 확장되어 대략 동등한 배가수의 세포의 집단을 형성한다. 로트는 바람직하게는 단일 태반의 조직으로부터 유래되지만, 다수의 태반의 조직으로부터 유래될 수 있다.

[0249] 한 실시양태에서, 태반 세포 로트가 하기와 같이 수득된다. 먼저 태반 조직을, 예를 들어, 다져서, 파괴하고, 적절한 효소, 예를 들어 콜라게나제로 소화시킨다 (상기 섹션 5.4.3 참조). 바람직하게는 태반 조직은, 예를 들어, 단일 태반으로부터의 전체 양막, 전체 용모막, 또는 양쪽 모두를 포함하지만, 양막 또는 용모막의 일부분만을 포함할 수 있다. 소화된 조직을, 예를 들어, 약 1-3주, 바람직하게는 약 2주 동안 배양한다. 비-부착성 세포의 제거 후, 형성된 고밀도 콜로니를, 예를 들어, 트립신처리에 의해, 수집한다. 이러한 세포들을 수집하고, 편리한 부피의 배양 배지에 재현탁시킨 후, 확장 배양물에 파종하는데 사용한다. 확장 배양물은 분리된 세포 배양 장치들, 예를 들어, 셀 팩토리(Cell Factory) (NUNC™)의 임의의 배열일 수 있다. 세포들은 확장 배양물에 예를 들어 1×10³, 2×10³, 3×10³, 4×10³, 5×10³, 6×10³, 7×10³, 8×10³, 9×10³, 1×10⁴, 1×10⁴, 2×10⁴, 3×10⁴, 4×10⁴, 5×10⁴, 6×10⁴, 7×10⁴, 8×10⁴, 9×10⁴, 또는 10×10⁴개의 줄기 세포가 파종되도록 임의의 정도로 세분될 수 있다. 바람직하게는, 약 1×10³ 내지 약 1×10⁴개 세포/cm²가 각각의 확장 배양물에 파종하는데 사용된다. 확장 배양물의 수는 세포가 수득되는 특정 태반(들)에 따라 수가 더 크거나 작을 수 있다.

[0250] 배양물 내의 세포의 밀도가 특정 값, 예를 들어, 약 1×10⁵개 세포/cm²에 이를 때까지 확장 배양물이 성장된다. 세포를 이러한 시점에서 수집 및 동결보존할 수 있거나, 또는 상기 기술된 바와 같이 새로운 확장 배양물 내로 계대시킬 수 있다. 세포는 사용 전에, 예를 들어, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 15회, 16회, 17회, 18회, 19회 또는 20회 계대될 수 있다. 바람직하게는 개체수 배가의 누적 횟수의 기록이 확장 배양(들) 동안 유지된다. 세포는 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 20회, 22회, 24회, 26회, 28회, 30회, 32회, 34회, 36회, 38회 또는 40회 배가, 또는 60회 배가까지 확장될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 세포의 집단을 개별적인 용량으로 나누기 전의 개체수 배가 횟수는 약 15 내지 약 30이다. 세포는 확장 프로세스 전반에 걸쳐 연속적으로 배양될 수 있거나, 또는 확장 동안 1회 이상 동결될 수 있다.

[0251] 개별적인 용량에 사용될 세포가 추후의 사용을 위해 동결, 예를 들어, 동결보존될 수 있다. 개별적인 용량은, 예를 들어, 약 1백만 내지 약 5천만개의 세포/ml를 포함할 수 있고, 전체적으로는 약 10⁶ 개 내지 10¹⁰ 개의 세

포를 포함할 수 있다.

[0252] 따라서, 한 실시양태에서, 다수의 제1 개체수 배가를 위해 인간 산후 태반으로부터 일차 배양 태반 세포를 확장시키는 단계; 상기 태반 세포를 동결보존하여, 마스터 세포 은행(Master Cell Bank)을 형성시키는 단계; 다수의 제2 개체수 배가를 위해 마스터 세포 은행으로부터 다수의 태반 세포를 확장시키는 단계; 상기 태반 세포를 동결보존하여, 작업용 세포 은행(Working Cell Bank)을 형성시키는 단계; 다수의 제3 개체수 배가를 위해 작업용 세포 은행으로부터 다수의 태반 줄기 세포를 확장시키는 단계; 및 상기 태반 세포를 개별적인 용량으로 동결보존하는 단계를 포함하고, 이때 상기 개별적인 용량들이 총괄적으로 태반 세포 은행을 구성하는 방법에 의해 태반 세포 은행이 제조될 수 있다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 일차 배양 태반 세포는 태반 관류액으로부터의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 일차 배양 태반 세포는 소화된 태반 조직으로부터의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 일차 배양 태반 세포는 태반 관류액 및 소화된 태반 조직으로부터의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포 일차 배양물 내의 상기 태반 세포 모두는 동일한 태반으로부터의 것이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 이러한 방법은 상기 작업용 세포 은행으로부터의 상기 다수의 태반 세포로부터 CD200⁺ 또는 HLA-G⁺ 태반 세포 또는 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포를 선별하여 개별적인 용량을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁴ 개 내지 약 10⁵ 개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁵ 개 내지 약 10⁶ 개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁶ 개 내지 약 10⁷ 개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁷ 개 내지 약 10⁸ 개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁸ 개 내지 약 10⁹ 개의 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 개별적인 용량은 약 10⁹ 개 내지 약 10¹⁰ 개의 태반 세포를 포함한다.

[0253] 본원에 제공된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포함하는 조성물의 제조 방법은 상기 기재된 임의의 단계에서 태반 세포 은행의 구조물에 일체화될 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 마스터 세포 은행을 생산한 후에, 및 상기 마스터 세포 은행으로부터 하나 이상의 작업용 세포 은행을 생산하는 동안에, 또는 상기 작업용 세포 은행으로부터 태반 세포의 확장 동안에 생산된다. 예를 들어, 태반 세포를 작업용 세포 은행으로부터 해동시키고, 다수의 개체수 배가를 위해 배양할 수 있다. 한 실시양태에서, 목적하는 수의 세포를 생성되는 경우, 또는 목적하는 수의 개체수 배가가 이루어진 경우, 태반 세포를 예를 들어 원심분리에 의해 수집하고, 예를 들어 텍스트란 40, 예를 들어 5.5% 텍스트란 40을 포함하는 용액 중에 재현탁시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 태반 줄기 세포를 다시 수집하고, 텍스트란 및 동결보존제를 포함하는 용액, 예를 들어 10% HSA 및 5% DMSO를 포함하는 5.5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시키고, 동결보존시킨다. 동결보존된 태반 세포를 예를 들어 사용하기 직전에, 예를 들어 상기 섹션 5.2에 기재된 조성물의 최종 생성 직전에 해동시킨다.

[0254] 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포함하는 조성물의 상기 제조 방법은 예를 들어 태반 세포가 동결보존되는 각각의 시점에, 또는 예를 들어 태반 세포가 최종 동결보존되기 전에 개체 투여를 위해 제조되는 시점에, 태반 세포 은행의 생산 및/또는 사용시에 한번 이용될 수 있다.

[0255] 바람직한 실시양태에서, 태반이 수득되는 공여자 (예를 들어, 모체)가 하나 이상의 병원체에 대해 시험된다. 시험된 병원체에 대해 모체가 양성이면, 태반으로부터의 전체 로트가 폐기된다. 이같은 시험은 태반 세포 로트 생산 동안의 임의의 시점에, 예컨대 초기 세포 배양물 복구 이전 또는 이후에, 또는 확장 배양 동안 수행될 수 있다. 존재에 대해 시험되는 병원체에는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염, 인간 면역결핍 바이러스 (I형 및 II형), 사이토메갈로바이러스, 헤르페스바이러스 등이 비제한적으로 포함된다.

[0256] **5.6 태반 세포의 보존**

[0257] 단리된 태반 세포, 예를 들어, 상기 섹션 5.2에 기술된 단리된 태반 다능성 세포를 예를 들어 수집 동안에 보존할 수 있고, 즉 예를 들어 수집 동안에, 또는 예를 들어 본원에 기재된 방법을 이용하여 본원에 기재된 조성물을 제조하기 전에 장기 보관을 허용하는 조건, 또는 예를 들어 아포토시스 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 놓을 수 있다.

[0258] 관련된 미국 출원 공개 번호 2007/0190042 (이의 개시 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와

같이, 예를 들어, 아포토시스 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 조성물을 사용하여, 태반 세포를 보존할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 제시된 세포를 포함하는 조성물에 사용되는 세포의 집단을 보존하는 방법은 상기 세포의 집단을 아포토시스 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 아포토시스 억제제는 아포토시스 억제제와 접촉되지 않은 세포의 집단과 비교하여 이러한 세포의 집단에서 아포토시스를 감소시키거나 방지하는데 충분한 양으로, 그리고 이에 충분한 시간 동안 존재한다. 구체적 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제는 카스파제 억제제이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제는 JNK 억제제이다. 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 JNK 억제제는 상기 세포의 분화 또는 증식을 조정하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포 수집 조성물은 분리된 상 내의 상기 아포토시스 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포 수집 조성물은 에멀전 내의 상기 아포토시스 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 유화제, 예를 들어, 레시틴을 추가적으로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 세포에 접촉하는 시점에 약 0°C 내지 약 25°C 사이이다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 아포토시스 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 세포에 접촉하는 시점에 약 2°C 내지 10°C 사이, 또는 약 2°C 내지 약 5°C 사이이다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 세포의 집단의 운반 도중에 수행된다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 세포의 집단의 동결 및 해동 동안 수행된다.

[0259] 태반 세포의 집단은, 예를 들어, 상기 세포의 집단을 아포토시스 억제제 및 기관-보존 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 아포토시스 억제제는 아포토시스 억제제와 접촉되지 않은 세포의 집단과 비교하여, 이러한 세포의 집단에서 아포토시스를 감소시키거나 방지하는데 충분한 양으로, 그리고 이에 충분한 시간 동안 존재하는 방법에 의해 보존될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 기관-보존 화합물은 UW 용액 (미국 특허 번호 4,798,824에 기술됨; 비아스팬(ViaSpan)으로 또한 공지됨; [Southard et al., Transplantation 49(2):251-257 (1990)]를 또한 참조) 또는 미국 특허 번호 5,552,267 (스틴(Stern) 등)에 기술된 용액이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 기관-보존 화합물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, 또는 이들의 조합물이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 산소-운반 퍼플루오로카본을 2-상 내에 또는 에멀전으로서 추가적으로 포함한다.

[0260] 이러한 방법의 또 다른 실시양태에서, 태반 줄기 세포는, 관류 동안, 아포토시스 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본, 장기-보존 화합물 또는 이들의 조합물을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 조직 파괴 프로세스, 예를 들어, 효소에 의한 소화 동안 상기 세포가 접촉된다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포가 관류에 의한 수집 후에, 또는 조직 파괴, 예를 들어, 효소에 의한 소화에 의한 수집 후에 상기 세포 수집 화합물과 접촉된다.

[0261] 전형적으로, 태반 세포 수집, 강화 및 단리 동안, 저산소증 및 기계적 스트레스로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 이러한 방법의 또 다른 실시양태에서, 세포 또는 세포의 집단이 상기 보존 동안 6시간 미만으로 수집, 강화 또는 단리 동안의 저산소성 조건에 노출되고, 이때 저산소성 조건은 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소 농도이다. 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 상기 보존 동안 2시간 미만 동안 상기 저산소성 조건에 노출된다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은, 수집, 강화 또는 단리 동안, 상기 저산소성 조건에 1시간 미만 또는 30분 미만 동안 노출되거나, 또는 저산소성 조건에 노출되지 않는다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포의 집단은 수집, 강화 또는 단리 동안 전단 스트레스에 노출되지 않는다.

[0262] 태반 세포는 일반적으로 또는 본원에 개시된 특정 방법으로 동결보존될 수 있다. 한 실시양태에서, 태반 세포를 동결보존시키기 위해 사용되는 동결보존제는 DMSO이다. 또 다른 실시양태에서, 동결보존제는 프로필렌 글리콜, 예를 들어 약 1.5M 프로필렌 글리콜이다. 동결보존제는 또한 예를 들어 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 폴리페놀 (예를 들어, 약 30 내지 약 120 ppm) 등일 수 있다. 다른 실시양태에서, 동결보존제는 DMSO, 트레할로스, 및 텍스트란 중 하나 이상과 조합된 태아 소 혈청, 인간 혈청, 또는 인간 혈청 알부민이다. 구체적 실시양태에서, 동결보존제는 인간 혈청, DMSO, 및 트레할로스이거나, 또는 태아 소 혈청 및 DMSO이다. 특정 실시양태에서, 태반 세포는 소형 컨테이너, 예를 들어 앰플 중에서 동결보존 배지에 동결보존된다. 바람직하게는 태반 세포는 동결보존 동안 약 1°C/분으로 냉각된다. 바람직한 동결보존 온도는 약 -80°C 내지 약 -180°C, 바람직하게는 약 -125°C 내지 약 -140°C이다. 동결보존된 세포는 사용하기 위해 해동하기 전에 액체 질소로 옮겨질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 일단 앰플이 약 -90°C에 도달하면, 이를 액체 질소 보관 구역으로 옮긴다. 동결보존은 속도 제어 동결기를 사용하여 또한 이루어질 수 있다. 바람직하게는 동결보존된 세포

는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도, 바람직하게는 약 37℃의 온도에서 해동된다.

[0263] **5.7 세포 함유 조성물**

[0264] 5.7.1 태반 세포를 포함하는 조성물

[0265] 본원에, 예를 들어 섹션 5.3에 기재된 태반 세포는 하나 이상의 태반 세포, 예를 들어 본원에 기재된 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포함할 수 있으며, 여기서 세포는 태반, 예를 들어 인간 태반으로부터 단리되었다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 임의의 상기 조성물은 매트릭스를 포함한다. 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 3차원 스캐폴드이다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 콜라겐, 젤라틴, 라미닌, 피브로넥틴, 펙틴, 오르니틴, 또는 비트로넥틴을 포함한다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 매트릭스는 양막 또는 양막-유래 생체재료이다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 세포의 막 단백질들을 포함한다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 합성 화합물을 포함한다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 매트릭스는 생활성(bioactive) 화합물을 포함한다. 또 다른 더욱 구체적 실시양태에서, 상기 생활성 화합물은 성장 인자, 사이토카인, 항체, 또는 5,000 달톤 미만의 유기 분자이다.

[0266] 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물, 예를 들어 제약 조성물에 유용한 조성물은 임의의 상기 태반 세포, 또는 임의의 상기 태반 세포의 집단에 의해 컨디셔닝된 배지를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 이러한 임의의 조성물은 태반으로부터 유래되지 않은 줄기 세포를 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 골수-유래 줄기 세포이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 전구 세포이다. 또 다른 보다 구체적 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 체성 줄기 세포이다. 훨씬 더 구체적 실시양태에서, 상기 체성 줄기 세포는 신경 줄기 세포, 간 줄기 세포, 위장 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 심장 줄기 세포, 또는 근육 줄기 세포이다.

[0267] 5.7.1.1 제약 조성물

[0268] 단리된 태반 세포의 집단, 또는 단리된 태반 세포를 포함하는 세포의 집단은 제약 조성물 내에 함유되거나 또는 그의 성분이다. 단리된 태반 세포는 개체에게 용이하게 투여가능한 형태, 예를 들어 의학적 용도에 적합한 컨테이너 내에 함유된 태반 관류액 세포 또는 단리된 태반 세포로 제조될 수 있다. 이러한 컨테이너는 예를 들어 주사기, 멸균 플라스틱 백, 플라스크, 병, 또는 태반 줄기 세포의 집단이 용이하게 분배될 수 있는 다른 컨테이너일 수 있다. 예를 들어, 컨테이너는 수용자에게 액체를 정맥내 투여하기에 적합한 혈액 백 또는 다른 플라스틱, 의학적으로 허용되는 백일 수 있다. 특정 실시양태에서, 컨테이너는 단리된 태반 세포의 집단의 동결보존을 허용한다.

[0269] 한 실시양태에서, 컨테이너는 본원에 기재된 방법 단계 중 하나 이상의 수행을 용이하게 하거나 허용하는 컨테이너이다. 예를 들어, 세포를 포함하는 조성물의 제조 방법이 예를 들어 (a) 상기 세포를 텍스트란 및 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함하는 용액과 접촉시켜 세포-함유 용액을 생성하는 단계; (b) 상기 용액을 여과하는 단계; (c) 상기 세포를 텍스트란을 포함하는 제1 회석 용액에 의해 약 1 내지 50×10^6 , 1 내지 40×10^6 , 1 내지 30×10^6 , 1 내지 20×10^6 , 1 내지 15×10^6 , 또는 1 내지 10×10^6 개 세포/mL로 회석하는 단계; 및 (d) 상기 세포를 텍스트란을 포함하지만 HSA는 포함하지 않는 제2 회석 용액에 의해 회석하는 단계를 포함하는 경우, 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포를 예를 들어 단계 (c)와 (d) 사이에 컨테이너에 들 수 있으며, 여기서 상기 컨테이너는 예를 들어 동결보존을 용이하게 하고/하거나 세포 등을 필요로 하는 개체에게 세포의 전달을 용이하게 하는 컨테이너이다. 특정 실시양태에서, 약 15×10^6 개 세포/mL 이하로 회석한다. 특정 실시양태에서, 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 이하로 회석한다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다.

[0270] 예를 들어, 단리된 태반 세포를 예를 들어 백, 예를 들어 혈액 백 또는 유사한 백에서 동결보존시키고, 해동시키며, 최종적으로 동일한 백에서 회석할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포를 포함하는 조성물의 제조 방법이 예를 들어 (a) 다수의 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포 또는 단리된 태반 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (b) 세포를 5.5% 텍스트란 40 중에 재현탁시키는 단계; (c) 세포를 원심분리하여 세포를 수집하는 단계; (d) 세포를 10% HSA를 포함하는 5.5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시키는 단계; (e) 세포를 70 μ m 내지 100 μ m 필터를 통해 여과하는 단계; (f) 세포를 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA, 및 5% DMSO 중에 약 10

± 3 x 10⁶개 세포/mL 이하로 희석하는 단계; (g) 세포를 동결보존시키는 단계; (h) 세포를 해동시키는 단계; 및 (i) 세포를 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:11로 희석하여 상기 제약 조성물을 생성하는 단계를 포함하는 경우, 예를 들어 동결보존 및/또는 세포를 그를 필요로 하는 개체에게로의 투여를 용이하게 하는 컨테이너 중에 세포를 두는 것은 예를 들어 단계 (e) 이후의 임의의 단계에서 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 1 내지 50 x 10⁶, 1 내지 40 x 10⁶, 1 내지 30 x 10⁶, 1 내지 20 x 10⁶, 1 내지 15 x 10⁶, 또는 1 내지 10 x 10⁶개 세포/mL로 희석한다. 특정 실시양태에서, 단계 (f)에서 약 15 x 10⁶개 세포/mL 이하로 희석한다. 다른 특정 실시양태에서, 세포의 수가 약 10 ± 3 x 10⁶개 세포/mL 미만인 경우, 여과는 임의적이다. 구체적 실시양태에서, 예를 들어 세포, 예를 들어 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포를 여과한 후에 컨테이너에 둔 다음, 희석하고, 동결보존시키고, 해동시키고/거나, 최종적으로 개체에게 투여하기 전에 희석할 수 있다.

[0271] 본원에 제공된 조성물, 예를 들어 제약 조성물 중의 단리된 태반 세포는 단일 공여자로부터 또는 다중 공여자로부터 유래된 태반 세포를 포함할 수 있다. 단리된 태반 세포는 의도된 수용자에게 완전히 HLA-일치하거나, 또는 부분적으로 또는 완전히 HLA-불일치할 수 있다.

[0272] 따라서, 한 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 중의 단리된 태반 세포는 그를 필요로 하는 개체에게 투여된다. 구체적으로, 상기 단리된 태반 세포는 근육내, 피내, 복막내, 동맥내, 피하, 정맥내 또는 안구내로 투여된다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 조성물 중의 단리된 태반 세포는 컨테이너 중에 단리된 태반 세포를 포함하는 조성물의 형태로 그를 필요로 하는 개체에게 투여된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 컨테이너는 백, 플라스크, 또는 병이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 백은 멸균 플라스틱 백이다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 백은 예를 들어 정맥내 주입, 볼루스 주사 등에 의해 상기 단리된 태반 세포의 정맥내 투여를 허용하거나 용이하게 하는데 적합하다. 백은 투여 이전에 또는 동안에 단리된 태반 세포와 하나 이상의 다른 용액, 예를 들어 약물의 혼합을 허용하도록 서로 연결된 다중 루멘 또는 구획을 포함할 수 있다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 동결보존 이전에, 단리된 태반 세포를 포함하는 용액은 합한 세포의 동결보존을 용이하게 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 생리학상-허용되는 수용액 내에 함유된다. 보다 구체적 실시양태에서, 상기 생리학상-허용되는 수용액은 0.9% NaCl 용액이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 단리된 태반 세포는 상기 세포의 집단의 수용자에게 HLA-일치하는 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 합한 세포는 상기 세포의 집단의 수용자에게 적어도 부분적으로 HLA-불일치하는 태반 세포를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 태반 세포는 다수의 공여자로부터 유래된다.

[0273] 제약 조성물 중의 단리된 태반 세포는 본원에 기재된 임의의 단리된 태반 세포이다. 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 단리된 태반 세포는 컨테이너 내에 함유된 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 세포이다. 구체적 실시양태에서, 본원에 기재된 단리된 태반 세포는 컨테이너 내에 함유된 CD200⁺, HLA-G⁺ 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 컨테이너 내에 함유된 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺ 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 컨테이너 내에 함유된 CD200⁺, OCT-4⁺ 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 컨테이너 내에 함유된 CD73⁺, CD105⁺ 세포이며, 여기서 상기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 태반 세포의 집단과 함께 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 동결보존되었고 컨테이너 내에 함유된 CD73⁺, CD105⁺, HLA-G⁺ 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 컨테이너 내에 함유된 OCT-4⁺ 세포이며, 상기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 태반 세포의 집단과 함께 배양할 때 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 한다. 임의의 상기 태반 세포의 구체적 실시양태에서, 상기 컨테이너는 백이다.

[0274] 다양한 구체적 실시양태에서, 상기 컨테이너는 대략, 최소 또는 최대 1 x 10⁶개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5 x 10⁶개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1 x 10⁷개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5 x 10⁷개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1 x 10⁸개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5 x 10⁸개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1 x 10⁹개의 단리된 태반 세포 또는 태반

관류액 세포, 5×10^9 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 또는 1×10^{10} 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포의 단일 단위 용량은 다양한 실시양태에서 대략, 최소 또는 최대 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 또는 그 이상의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포의 컨테이너 또는 용량은 1×10^5 내지 5×10^5 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5×10^5 내지 1×10^6 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1×10^6 내지 5×10^6 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5×10^6 내지 1×10^7 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1×10^7 내지 5×10^7 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5×10^7 내지 1×10^8 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1×10^8 내지 5×10^8 개의 단리된 태반 또는 태반 관류액 세포, 5×10^8 내지 1×10^9 개의 단리된 태반 또는 태반 관류액 세포, 1×10^9 내지 5×10^9 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 5×10^9 내지 1×10^{10} 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 1×10^{10} 내지 5×10^{10} 개의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포, 또는 그 이상의 단리된 태반 또는 태반 관류액 세포를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 제약 조성물은 수용자 1 kg당 약 2×10^7 내지 약 10×10^7 개 세포를 투여하기에 충분한 개수의 단리된 태반 세포 또는 태반 관류액 세포를 포함한다.

[0275] 임의의 상기 동결보존된 집단의 다른 특정 실시양태에서, 상기 세포는 대략, 최소 또는 최대 5회, 최대 10회, 최대 15회, 또는 최대 20회 계대되었다. 임의의 상기 동결보존된 세포의 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 세포는 상기 컨테이너 내에서 확장되었다.

[0276] 본원에 기재된 태반 줄기 세포를 포함하는 제약 조성물은 본원에 기재된 임의의 단리된 태반 세포의 집단 또는 단리된 태반 세포 유형의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 제약 조성물은 태아 태반 세포, 모체 태반 세포, 또는 태아 및 모체 태반 세포 둘 다, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포를 포함할 수 있다. 본원에 제공된 제약 조성물은 단일 개체 또는 태반으로부터 또는 다수의 개체 또는 태반으로부터 수득된 단리된 태반 세포를 추가로 포함할 수 있다.

[0277] 본원에 제공된 제약 조성물은 50% 생존 세포 또는 그 이상을 포함하는 세포의 집단을 포함한다 (즉, 집단 중 50% 이상의 세포가 기능하거나 살아있음). 바람직하게는, 집단 중의 세포의 60% 이상이 생존성이다. 더욱 바람직하게는, 제약 조성물에서 집단 중의 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%가 생존성이다.

[0278] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 실질적으로 또는 완전히 비-모체 기원인, 즉 태아 유전자형을 갖는 단리된 태반 세포를 포함하며, 예를 들어 적어도 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 약 100%가 비-모체 기원이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 제약 조성물은 $CD200^+$ 및 $HLA-G^+$; $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$; $CD200^+$ 및 $OCT-4^+$; $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$; $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포의 집단을 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 $OCT-4^+$ 이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포의 집단을 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 이들의 조합인 단리된 태반 세포의 집단을 포함하며, 여기서 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 $CD10^+$, $CD105^+$ 및 $CD34^-$; $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 및 $CD34^-$; $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 이고, $CD90^+$ 또는 $CD45^-$; $CD10^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 및 $CD45^-$; $CD10^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 및 $CD45^-$; $CD200^+$ 및 $HLA-G^+$; $CD73^+$, $CD105^+$, 및 $CD200^+$; $CD200^+$ 및 $OCT-4^+$; $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA-G^+$; $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 중 하나 이상이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; $OCT-4^+$ 이며, 상기 태반 세포의 집단을 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양할 때 상기 단리된 태반 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서

하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나; 또는 CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻, CD80⁻, CD86⁻, HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻ 및/또는 PDL1⁺ 중 하나 이상이거나; 또는 이들의 조합인 단리된 태반 세포의 집단을 포함하며, 여기서 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 상기 단리된 태반 세포는 비-모체 기원이다. 구체적 실시양태에서, 제약 조성물은 태반으로부터 수득되지 않은 줄기 세포를 추가로 포함한다.

[0279] 본원에 제공된 제약 조성물은 예를 들어 생착을 용이하게 하는 하나 이상의 화합물 (예를 들어, 항-T-세포 수용체 항체, 면역억제제 등); 안정화제, 예컨대 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 히드록시에틸 전분, 플라즈마라이트 등을 포함할 수 있다.

[0280] 5.7.2 조혈 태반 세포 또는 태반 관류액 세포를 포함하는 조성물

[0281] 본원에 제공된 조성물의 특정 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁺ 태반 줄기 세포, 예를 들어 조혈 태반 세포 또는 전구 세포이다. 이러한 세포는 태반 조직, 예를 들어 재대혈이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 태반으로부터 수득가능하다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 태반 줄기 세포는 CD38⁺이다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 단리된 태반 세포는 CD38⁻이다. 다른 특정 실시양태에서, CD34⁺ 단리된 태반 세포는 CD45⁺이다. 구체적 실시양태에서, 단리된 태반 세포는 CD34⁺, CD38⁻ 및 CD45⁺이다. 특정 실시양태에서, 세포는 조혈 세포이다. 보다 구체적 실시양태에서, 태반 CD34⁺ 세포는 조혈 세포이다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 세포 또는 조혈 세포는 태반 관류액으로부터 수득된다. 특정 실시양태에서, CD34⁺ 세포 또는 조혈 세포는 태반 조직의 효소에 의한 소화 또는 물리적 파괴에 의해 수득된다. CD34⁺ 세포 및 조혈 세포는 단일 태반으로부터 또는 하나 초과 태반으로부터 수득될 수 있다.

[0282] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 제제화된 본원에 제공된 조성물의 세포는 태반 관류액으로부터 수득된 세포이다. 본원에 사용된 "태반 관류액으로부터 수득된 세포"에는 태반 관류액으로부터 수득된, 예를 들어 그로부터 단리된 전체 유핵 세포, 태반 관류액으로부터 수득된 유핵 세포의 하위세트, 또는 태반 관류액으로부터 수득된 세포로부터 배양 또는 증식된 세포가 포함된다. 태반 관류액은, 태반 세포를 수득하기 위해 관류하기 전에, 재대혈이 배출되었고 잔류 혈액을 제거하도록 관류된 태반으로부터 수득될 수 있다. 태반 관류액은 재대혈이 배출되었으나, 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지 않은 태반으로부터 수득될 수 있다. 태반 관류액은 재대혈이 배출되지 않았고 잔류 혈액을 제거하도록 관류되지 않은 태반으로부터 수득될 수 있다. 상기 두 후자의 실시양태에서, 태반 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 전체 유핵 세포는 태반 혈액 및/또는 재대혈로부터의 유핵 세포를 포함하고, 태반 관류액 세포는 단일 태반으로부터 또는 하나 초과 태반으로부터 수득될 수 있다.

[0283] 5.7.3 불멸화 태반 세포주

[0284] 성장-촉진 유전자, 즉, 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성이 외부 인자에 의해 조절가능하도록, 형질감염된 세포의 성장을 적합한 조건 하에 촉진하는 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 임의의 적절한 벡터의 형질감염에 의해 포유동물 태반 세포가 조건부로 불멸화될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 성장-촉진 유전자는 v-myc, N-myc, c-myc, p53, SV40 대형 T 항원, 폴리오마 대형 T 항원, E1a 아데노바이러스, 또는 인간 유두종 바이러스의 E7 단백질과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 종양유전자이다.

[0285] 성장-촉진 단백질의 외부 조절은 성장-촉진 유전자를 외부-조절가능 프로모터, 예를 들어, 형질감염된 세포의 온도 또는 세포와 접촉되는 배지의 조성을 변화시킴으로써 예를 들어 활성이 제어될 수 있는 프로모터의 제어 하에 놓음으로써 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 테트라사이클린 (tet)-제어 유전자 발현 시스템이 사용될 수 있다 ([Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992]; [Hoshimaru et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1518-1523, 1996] 참조). tet의 부재 하에, 이러한 벡터 내의 tet-제어 트랜스액티베이터(transactivator) (tTA)가 tet 오퍼레이터 서열에 융합된 인간 사이토메갈로바이러스로부터의 최소 프로모터인 p_{CMV*}-1로부터의 전사를 강력하게 활성화시킨다. tTA는 대장균의 트랜스포존-10-유래 tet 저항성 오페론의 억제인자 (tetR)와 단순 포진 바이러스의 VP16의 산성 도메인의 융합 단백질이다. tet의 낮은 비-독성 농도 (예를 들어, 0.01-1.0 μg/ml)에서 tTA에 의한 트랜스액티베이션(transactivation)이 거의 완전히 폐지된다.

[0286] 한 실시양태에서, 벡터는 선별가능 마커, 예를 들어, 약물 저항성을 부여하는 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 함유한다. 박테리아 네오마이신 저항성 유전자 (neo^R)가 본 발명에서 사용될 수 있는 이같은 마커이다.

neo^R을 보유하는 세포는 당업자에게 공지된 수단, 예컨대 성장 배지에 예를 들어 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 G418을 첨가하는 것에 의해 선별될 수 있다.

[0287] 형질감염은 레트로바이러스 감염이 포함되지만 이에 한정되지 않는, 당업자에게 공지된 다양한 수단들 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있다. 일반적으로, 벡터에 대한 생산자 세포주로부터 수집된 컨디셔닝 배지와 N2 보충물을 함유하는 DMEM/F12의 혼합물과의 인큐베이션에 의해 세포 배양물이 형질감염될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이 제조된 태반 세포 배양물이 1 부피의 컨디셔닝 배지 및 2 부피의 N2 보충물 함유 DMEM/F12에서의 약 20시간 동안의 인큐베이션에 의해 시험관 내에서 예를 들어 5일 후에 감염될 수 있다. 그 후, 선별가능 마커를 보유하는 형질감염된 세포가 상기 기술된 바와 같이 선별될 수 있다.

[0288] 형질감염 후, 증식을 허용하는, 예를 들어, 세포의 30% 이상이 24시간의 기간 내에 배가되도록 하는 표면 상에 배양물이 계대된다. 바람직하게는, 기관은 폴리오르니틴 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및/또는 라미닌 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 코팅된 조직 배양 플라스틱으로 구성된 폴리오르니틴/라미닌 기관, 폴리라이신/라미닌 기관 또는 피브로넥틴으로 처리된 표면이다. 그 후, 하나 이상의 증식-강화 인자가 보충되었거나 보충되지 않았을 수 있는 성장 배지가 배양물에 3-4일마다 공급된다. 배양물이 50% 미만의 전면성장일 때 증식-강화 인자가 성장 배지에 첨가될 수 있다.

[0289] 80-95% 전면성장되었을 때, 표준 기술을 사용하여, 예컨대 트립신처리에 의해 조건부로 불멸화된 태반 세포주가 계대될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 20회의 계대까지, 선별을 유지하는 것이 유리하다 (예를 들어, 네오마이신 저항성 유전자를 함유하는 세포에 대한 G418의 첨가에 의해). 또한 장기 보관을 위해 세포를 액체 질소 내에 동결시킬 수 있다.

[0290] 상기 기술된 바와 같이 제조된 조건부로 불멸화된 인간 태반 세포주로부터 클론 세포주가 단리될 수 있다. 일반적으로, 이같은 클론 세포주를 표준 기술을 사용하여, 예컨대 제한 효소에 의해 또는 클로닝 링(cloning ring)을 사용하여 단리할 수 있고, 확장할 수 있다. 일반적으로, 상기 기술된 바와 같이 클론 세포주에 영양을 공급하고 계대시킬 수 있다.

[0291] 클론성일 수 있지만 반드시 클론성일 필요는 없는, 조건부로 불멸화된 인간 태반 세포주는, 일반적으로, 분화를 촉진하는 배양 조건 하에 성장-촉진 단백질의 생산 및/또는 활성을 억제함으로써 분화되도록 유도될 수 있다. 예를 들어, 성장-촉진 단백질을 코딩하는 유전자가 외부적으로 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있는 경우, 조건, 예를 들어, 배지의 조성 또는 온도를 변형하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제할 수 있다. 상기 논의된 테트라사이클린-제어 유전자 발현 시스템에 대해, 테트라사이클린을 첨가하여 성장-촉진 유전자의 전사를 억제함으로써 분화가 달성될 수 있다. 일반적으로, 4-5일 동안의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 테트라사이클린이 분화를 개시시키는데 충분하다. 추가적인 분화를 촉진하기 위해, 추가적인 작용제가 성장 배지에 포함될 수 있다.

[0292] 5.7.4 키트

[0293] 또 다른 측면에서, 단리된 태반 세포를 함유하는 본 발명의 조성물의 제조 및/또는 투여를 위한 키트가 추가로 본원에 제공된다.

[0294] 한 실시양태에서, 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 40을 포함하는 용액, 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함하는 용액, 및 동결보존제 중 하나 이상을 별도의 컨테이너에 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 구체적 실시양태에서, 상기 키트는 다수의 단리된 태반 세포, 예를 들어 동결보존된 단리된 태반 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 키트는 5.5% 텍스트란 40 (w/v) 및 10% HSA (w/v)을 포함하는 용액이 포함된 컨테이너를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 키트는 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 5% DMSO를 포함하는 용액이 포함된 컨테이너를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 상기 키트는 10% 텍스트란 40의 용액이 포함된 컨테이너를 포함한다.

[0295] 또 다른 실시양태에서, 상기 키트는 세포 현탁액을 여과하는데 적합한 필터, 또는 다수의 필터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 키트 중 하나 이상의 필터는 약 50 μm 의 직경 내지 약 150 μm 의 직경을 갖는 공극을 포함한다. 보다 구체적 실시양태에서, 필터는 70 μm 필터이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 필터는 100 μm 필터이다.

[0296] 또 다른 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 조성물 중 하나의 제조 및 사용에 적합한 유리 제품 또는 플라스틱 제품의 하나 이상의 부품을 포함한다. 예를 들어, 키트는 예를 들어 세포 현탁액, 예를 들어 단리된 태반 세포의 현탁액의 동결보존 또는 희석 또는 전달에 적합한 플라스틱 백을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 (1) 예를 들어 하나 이상의 바이알 중 다수의 단리된 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태

반 다능성 세포; (2) 상기 단리된 태반 세포 예를 들어 2-3회 개대 배양하기에 충분한 플라스틱 제품; (3) 5.5% 텍스트란 40 (w/v) 및 10% HSA (w/v)를 포함하는 용액이 포함된 컨테이너; (4) 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 5% DMSO를 포함하는 용액이 포함된 컨테이너; (5) 10% 텍스트란 40 용액이 포함된 컨테이너; 및 (6) 약 50 μm 의 직경 내지 약 150 μm 의 직경을 갖는 공극을 포함하는, 세포를 포함하는 용액을 여과하는데 적합한 하나 이상의 필터를 포함한다.

[0297] **6. 실시예**

[0298] **6.1 실시예 1: 단리된 태반 세포를 포함하는 투여가능한 조성물의 개선된 제조 방법**

[0299] 본 실시예는 동결보존 이전 및 이후 둘 다에서 인간 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 단리된 태반 세포의 제제가 인간 또는 동물에게의 투여를 위한 균일한 높은 생존율의 단리된 태반 세포를 생성하는 것을 입증한다. 생성된 조성물은 해동후 적어도 4 시간에 걸쳐 높은 생존율을 나타내고 거대 세포 덩어리는 나타내지 않는 단리된 태반 세포를 포함한다. 급성 투여 마우스 연구는, NOD/SCID 마우스가 정맥내 주입 투여에 의해 하기 기재된 최종 제제를 사용하여 임의의 심장 또는 폐 독성 없이 (분만 호흡, 순환 및 운동실조에 의해 증명됨) 적어도 1.5×10^6 개 세포/마우스 (평균 체중 20 g으로 추정하여 대략 75×10^6 개 세포/kg)의 최대 용량, 및 피하 250×10^6 개 세포/kg까지에 대해 관용성이었음이 입증되며, 이는 기존의 제제에 비해 개선된 것이다. 하기 실시예는 특정 표면 마커를 발현하는 단리된 태반 세포의 제제를 기재하며, 본원에 제시된 결과는 상기 방법 및 제제가 상이한 표면 마커를 발현하는 다른 세포, 예를 들어 포유동물 세포와 함께 사용될 수 있으며 그들과 상용성임을 나타낸다.

[0300] *세포 덩어리 검정*

[0301] 세포 덩어리 (응집체)를 거대 세포 덩어리 또는 미세 세포 덩어리로 분류하였다. 거대 세포 덩어리 및 미세 세포 덩어리는 존재하는 경우 하기 절차에 따라 식별되었다.

[0302] *거대 세포 덩어리 검정*

[0303] 세포를 단지 작은 얼음 조각만이 컨테이너에 잔류할 때까지 37°C 수조의 컨테이너에서 해동시켰다. 세포를 16 게이지 니들이 장착된 주사기를 이용하여 컨테이너로부터 도출해내고, 세포를 용기로부터 50 mL 원추형 시험관으로 분배하였다. 거대 세포 덩어리의 존재 또는 부재를 육안 검사에 의해 평가하였다.

[0304] *미세 세포 덩어리 검정*

[0305] 세포를 계수하여 세포 농도를 측정하였다. 이어서, 세포를 10% 텍스트란 40에 의해 4×10^6 세포/mL로 희석하고, 50 μL 의 세포, 40 μL 의 10% 텍스트란 40, 및 10 μL 의 40 μM 측정 비드 용액을 1.7 mL 미세원심분리 시험관에 첨가하였다. 시험관의 내용물을 부드럽게 혼합하였다. 10 μL 의 혼합된 샘플을 유리 슬라이드 상에 놓고, 커버 슬립을 덮었다. 3개 이상의 세포를 포함하는 모든 미세 세포 덩어리를 계수하였다.

[0306] 사용된 태반 세포는 동결보존 이전에 4-6회 계대를 거친 상기 기재된 바와 같은 부착성 태반 세포의 집단을 함유하는 세포 은행으로부터 초기에 단리되었다.

[0307] 두 가지 상이한 단리된 태반 세포주를 사용하는 생체내 주사 적합성 완충액의 비교로부터의 데이터는, 인산염 완충 염수 (PBS), 플라즈마라이트 A 및 돌베코 변형 이글 배지 배지 (DMEM) (1% 인간 혈청 알부민 (HSA)이 보충됨)가 모두 해동 5 시간 후에 높은 생존율을 유지할 수 있음을 나타낸다. 완충액 중 최종 세포 농도는 25×10^6 개 세포/mL이었다. 플라즈마라이트 A는 시험된 완충액에 대한 세포의 최고 높은 생존율을 촉진시키는 것으로서 선택되었다. 표 10a 및 표 10b에서 입증되는 바와 같이, 높은 생존율은 해동후 수시간 동안 유지되었고, 게다가 명목상 표현형은 해동후 3 시간에 걸쳐 변화되지 않았다. 해동후 제제에서 세포의 생존율은 26-게이지 니들을 통한 세포의 통과후에 유의한 영향을 받지 않았다. 이들 두 실험에서 세포 덩어리 형성의 측정은 사용된 적은 샘플 부피로 인해 불가능하였다.

[0308] 표 1a 및 표 1b의 데이터에 기초하여, 해동후 제제를 다음과 같이 완성하였다: 세포를 37°C에서 수조에서 해동시키고, 즉시 해동 완충액 (2.5% HSA + 5% 텍스트란 40)에 의해 1:1 (v/v)로 희석하였다. 이어서, 세포를 400g에서 5 분 동안 원심분리하고, 플라즈마라이트 A + 1% HSA 중에 재현탁시켰다.

[0309] <표 1a>

주사기/니들 시험을 하지 않은 경우의 플라즈마라이트 A+1% HSA 중 태반 세포의 해동후 생존율 및 표현형

	0시간	1시간	3시간	5시간
생존율	98.0%	97.1%	92.4%	93.8%
CD105+/200+	84.3%		87.9%	

[0310]

[0311] <표 1b>

주사기/니들 시험을 한 경우의 플라즈마라이트 A+1% HSA 중 태반 세포의 해동후 생존율 및 표현형

	0시간	1시간	3시간	5시간
생존율	98.0%	97.2%	93.7%	97.3%
CD105+/200+	87.3%		87.3%	

[0312]

[0313] *마우스 생체분포 연구*

[0314] 상기 해동후 제제를 과일렛 마우스 생체분포 연구에 적용하였다. 거대 세포 덩어리를 해동후 세포 제조 동안에, 특히 플라즈마라이트의 첨가후에 관찰하였다. 이 세포 제조물에서, 급성 폐 독성이 매회 0.5×10^6 개 세포의 2회 반복 정맥내 주입에 의해 1×10^6 개 세포/마우스 (대략 20g)의 용량에서 관찰되었다. 이들 두 관찰은 태반 세포 제제의 추가 조사를 촉구시켰다.

[0315] 유의한 세포 덩어리가 텍스트란 40이 아니라 플라즈마라이트 A의 첨가후에 유도된 과일렛 마우스 생체분포 연구로부터의 관찰에 기초하여, 텍스트란 40을 플라즈마라이트 A, HSA 및 PBS와 함께 희석 배지로서 이 연구에 사용하였다.

[0316] <표 2>

해동 4시간 후 세포 덩어리 순위. 숫자가 작을수록 덩어리가 더 적음을 나타낸다.

배지	5% 텍스트란 40 + 10% HSA	5% 텍스트란 40 + 2.5% HSA	5% 텍스트란 40	PBS	플라즈마라이트 A
세포 덩어리 순위	1	1	2	3	3

[0317]

[0318] 플라즈마라이트 A + 10% HSA + 5% DMSO 중에 미리 동결시킨 세포를 37°C 수조에서 해동시키고, 각각의 원충액에 의해 1:7로 희석하였다. 표 2의 데이터는 HSA를 함유한 텍스트란 40이 시험한 배지 중에서 가장 적은 세포 덩어리를 유도하였음을 보여준다.

[0319] 세포 응집체를 다양한 제제에서 해동 직후에 관찰하였다. 해동후 세포를 100 μm 필터를 통해 여과하는 여과 단계의 추가는 세포 응집체를 제거하였다. 2 로트의 태반 세포를 특정 희석제와 조합하여 여과의 효과에 대해 시험하였다. 세포를 해동후 4 시간에 걸쳐 10% 텍스트란 40에 의해 1:1로 희석하였을 때 여과후에 거대 세포 덩어리가 형성되지 않았다. 표 3a-3c를 참조한다. 또한, 생존율이 높게 유지되었다. 유사한 결과가 몇몇 상이한 로트의 태반 세포에서 관찰되었다.

[0320] <표 3a>

거대 세포 덩어리

	로트 1		로트 2	
해동 후 백에 존재하는 거대 세포 덩어리	예, 큰 시트		예, 작은 도트	
여과후 새로 형성된 거대 세포 덩어리	플라즈마라이트 A	5% 텍스트란 40	플라즈마라이트 A	5% 텍스트란 40
	예	아니오	예, 그러나 로트1 보다는 훨씬 적음	아니오

[0321]

[0322] <표 3b>

텍스트란 40 중 여과후 미세 세포 덩어리

	로트 1	로트 2
3-5 세포 덩어리 (덩어리 / 10 ⁶ 세포)	1210	416
5 세포 덩어리 (덩어리 / 10 ⁶ 세포)	491	119

[0323]

[0324] <표 3c>

텍스트란 40 및 플라즈마라이트 A 중 여과후 생존율

	로트 1		로트 2	
	텍스트란 40	플라즈마라이트 A	텍스트란 40	플라즈마라이트 A
0시간	91.5%	92.4%	94.2%	94.5%
2시간	92.5%		93.9%	
4시간	91.8%	94.7%	94.7%	93.3%

[0325]

[0326] 상기 연구에 기초하여, 해동후 제제 태반 세포를 하기 절차에 따라 단순화하였다: 세포를 37℃ 수조에서 3분 이하 동안 해동시킨 다음, 100 μm 스트레이너를 통해 여과하였다. 이어서, 걸러진 세포를 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 (v:v)로 희석하였다.

[0327] 동결전 제제

[0328] 세포 덩어리를 또한 세포 프로세싱의 동결전 상에서 관찰하였다. 동결 배지, 동결 세포 밀도 및 현탁액 여과 단계를 동결 이전에 세포 응집체를 감소 및/또는 제거하는 것에 대해 연구하였다.

[0329] 동결 배지

[0330] 상기 해동후 제제 중 텍스트란 40의 성공에 기초하여, 텍스트란 40을 동결 배지로서 플라즈마라이트와 비교하였다. 로트 3으로부터의 세포를 플라즈마라이트 A + 10% HSA + 5% DMSO 중에 또는 5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO 중에 17 x 10⁶ 개 세포/mL의 농도로 동결시켰다. 세포 덩어리의 존재를 다음과 같이 평가하였다:

[0331] <표 4a>

동결 배지로서 플라즈마라이트 및 텍스트란 40의 비교 - 거대 세포 덩어리

	플라즈마라이트 A	텍스트란 40
거대 세포 덩어리	텍스트란 40보다 많음	플라즈마라이트 A보다 적음
100μm 스트레이너로 여과후 세포 손실	20%	3%

[0332]

[0333] <표 4b>

동결 배지로서 플라즈마라이트 A 및 텍스트란 40의 비교 - 미세 세포 덩어리

	플라즈마라이트 A	텍스트란 40
3-5 세포 덩어리 (덩어리 / 10 ⁶ 세포)	1893	523
> 5 세포 덩어리 (덩어리 / 10 ⁶ 세포)	929	205

[0334]

[0335] <표 4c>

동결 배지로서 플라즈마라이트 A 및 텍스트란 40의 비교 - 생존율

	플라즈마라이트	텍스트란 40
해동 0시간 후	89.9%	90.8%
해동 4시간 후	89.2%	91.3%

[0336]

[0337] 이들 실험에서 텍스트란 40의 사용은 플라즈마라이트 A의 사용에 비해 더 적은 거대 세포 덩어리, 더 적은 미세 세포 덩어리, 및 더 높은 세포 생존율을 나타내었다. 이들 결과에 기초하여, 텍스트란 40을 동결 배지로서 선

택하였다.

[0338] 동결 세포 밀도 및 동결전 여과

[0339] 거대 세포 덩어리를 제거하고 미세 세포 덩어리를 최소화하기 위해, 세포 밀도 및 동결전 여과를 다음과 같이 실험하였다:

[0340] <표 5a>

세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도 및 동결전 여과의 영향

	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4
여과	예, 70 μm 스트레이너	아니오	예, 70 μm 스트레이너	아니오
농도	20×10^6	20×10^6	5×10^6	5×10^6
동결 배지	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO

농도 : 세포/밀리리터

[0341]

[0342] <표 5b>

거대 세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도 및 동결전 여과의 영향

	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4
동결전 여과	아니오	예	아니오	예
해동후 여과	아니오	예	아니오	예

아니오: 거대 덩어리 형성 없음, 예: 거대 덩어리 형성

[0343]

[0344] <표 5c>

미세 세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도 및 동결전 여과의 영향 (덩어리/ 10^6 세포)

	조건 1		조건 2		조건 3		조건 4	
	3-5 미세 세포 덩어리	>5 세포 덩어리	3-5 세포 덩어리	>5 세포 덩어리	3-5 세포 덩어리	>5 세포 덩어리	3-5 세포 덩어리	>5 세포 덩어리
동결전	188	0	291	194	231	46	237	172
해동후	688	375	631	655	231	116	323	366

[0345]

[0346] 표 5b 및 5c에 도시된 결과는 명백히 동결전 여과가 해동후 거대 세포 덩어리 형성을 제거함을 보여준다. 데이터는 또한 높은 세포 농도, 예를 들어 20×10^6 개 세포/mL를 가진 샘플이 해동후 미세 세포 덩어리를 형성하는 잠재력이 더 크다는 것을 나타낸다. 결과적으로, 세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도의 영향을 추가로 실험하였다.

[0347] <표 6a>

세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도의 영향

로트 4	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4
농도	15×10^6	10×10^6	7.5×10^6	5×10^6
여과	70 μm 스트레이너	70 μm 스트레이너	70 μm 스트레이너	70 μm 스트레이너
동결 배지	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO	5% 텍스트란 40 + 10% HSA + 5% DMSO

농도 : 세포 수/밀리리터

[0348]

[0349] <표 6b>

거대 세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도의 영향

	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4
동결전	예 (1 덩어리)	아니오	아니오	아니오
해동 0시간 후	예 (3 덩어리)	예 (1 덩어리)	아니오	아니오
해동 4시간 후	예 (3 덩어리)	예 (1 덩어리)	아니오	아니오

아니오: 거대 세포 덩어리 형성 없음, 예: 거대 세포 덩어리 형성

[0350]

[0351] <표 6c>

미세 세포 덩어리 형성에 대한 동결 세포 밀도의 영향 (덩어리/10⁶세포)

	조건 1		조건 2		조건 3		조건 4	
	3-5 세포	>5 세포	3-5 세포	>5 세포	3-5 세포	>5 세포	3-5 세포	>5 세포
동결전	141	70	130	65	83	33	103	34
해동 0시간 후	271	193	111	44	102	34	108	46
해동 4시간 후	298	212	105	53	122	44	97	55

[0352]

[0353] 표 6b 및 6c의 결과는, 7.5 x 10⁶/ml 이하의 동결 밀도가 해동후 거대 세포 덩어리를 유도하지 않음을 입증한다. 게다가, 10 x 10⁶개 세포/mL 이하의 농도에서, 미세 세포 덩어리의 수는 10⁶개 세포당 200개 미만의 미세 세포 덩어리로 합리적으로 낮았다.

[0354] 상기 결과에 기초하여, 동결전 및 해동후 제제를 다음과 같이 생성하였다. 동결전 제제의 경우, 액체 배양물로부터 태반 세포를 220 x g에서 5 분 동안 원심분리하고, 5% 텍스트란 40 중에 약 7.5 x 10⁶개 세포/mL로 재현탁시켰다. 세포를 400 x g에서 10 분 동안 원심분리한 다음, 6% 텍스트란 40 및 10% HSA 중에 약 7.5 x 10⁶개 세포/mL로 재현탁시켰다. 이어서, 재현탁된 세포를 중력에 의해 70 μm 필터에 통과시켰다. 이어서, 여과된 세포를 5% 텍스트란 40, 10% HSA, 및 5% DMSO 중에 약 7.5 x 10⁶개 세포/mL의 농도로 희석하였다. 희석된 세포를 동결-백에 넣고, 동결시키고, 증기 상 질소 하에서 저장하였다. 해동후 제제의 경우, 동결된 세포를 37°C 수조에서 해동시킨 다음, 10% 텍스트란 40에 의해 1:1 내지 1:5의 다양한 부피비의 세포-함유 완충액:텍스트란 40으로 희석하였다.

[0355] 태반 세포 제제의 평가

[0356] 1. 해동후 거대 세포 덩어리 형성 없음

[0357] 5개 로트의 태반 세포를 상기 제제화 방법을 이용하여 생성하였다 (하기 기재된 로트 11 및 로트 12 포함). 해동후 거대 세포 덩어리는 5개의 로트 중 어느 것에서도 관찰되지 않았고, 미세 세포 덩어리의 수는 낮게 유지되었다.

[0358] 2. 표현형에 대한 영향 없음

[0359] 태반 세포의 표현형은 개선된 제제에 의해 영향을 받지 않았다. 제제 중의 90% 초과 세포가 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺ 및 CD200⁺으로 유지되었다.

[0360] 3. GLP 마우스 연구

[0361] 로트 12 세포를 마우스 생체분포 연구를 위해 사용하였다. 태반 세포를 수컷 및 암컷 NOD-SCID 둘 다에게 또는 수컷 C57BL/10SgSnAi-Rag2(tmi)γc(tmi) 마우스에게 단일 및/또는 반복 정맥내 꼬리 정맥 주사로서 상기 제제 중에서 투여하였다. 마우스를 처리후 4, 14, 28 또는 47일째에 희생시키고, 폐, 간, 심장, 신장, 비장, 부신, 골수, 및 뇌의 샘플을 가공하여, hTERT DNA 서열의 존재에 대해 Q-PCR에 의해 분석하였고, hTERT는 인간 텔로머라제 역전사효소 유전자이다. i.v. 투여 후, 인간 DNA를 투여 4일후에 희생시킨 마우스의 폐, 뇌, 심장 및/또는 간의 샘플로부터의 단리된 전체 DNA에서 검출하였다. 가장 높은 수준의 DNA는 폐에서 검출되었다. 마우스는 어떠한 심장 또는 폐 독성 없이도 정맥내 주입에 의한 25-100 x 10⁶개 세포/kg 투여에 대해 관용성일 수 있

었다. 로트 11 세포를 중앙형성 마우스 연구를 위해 사용하였다. 마우스에게 부작용이 전혀 없이 250×10^6 개 세포/kg까지 피하 (SC) 투여하였다.

6.2 실시예 2: 개선된 투여가능한 조성물

본 실시예는 심지어 동결보존 후에도 인간 또는 동물에게 투여하기에 적합한 균일한 높은 생존율의 세포를 나타내는 인간 다능성 조직 배양 플라스틱-부착성 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 태반 세포의 제제를 입증한다. 제제의 세포는 정맥내 마우스 모델에서 이전의 제제에 비해 형성된 응집체의 양의 평균 400배 감소, 및 대략 3배 개선된 최대 내약 용량 (MTD)을 나타낸다 (데이터는 도시하지 않음). 하기 실시예는 특정 표면 마커를 발현하는 단리된 태반 세포의 제제를 기재하며, 본원에 제시된 결과는 상기 방법 및 제제가 상이한 표면 마커를 발현하는 다른 세포, 예를 들어 포유동물 세포와 함께 사용될 수 있으며 그들과 상용성임을 나타낸다.

제제 ("제제 B"로 지정)는 5.5% (w/v) 텍스트란 40, 10% (w/v) 인간 혈청 알부민 (HSA), 및 5% (v/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 함유하는 용액 중에 상기 세포 표현형을 갖는 태반 세포를 $10 \pm 3 \times 10^6$ 개 세포/mL의 농도로 포함한다. 본원에 사용된 HSA 및 텍스트란 40은 임상적 등급이고, DMSO는 GMP 등급이다.

표 7에 "제제 A"로 지정된 플라즈마라이트-기재 제제를 기재하며, 제제 B인 텍스트란 40 기재 제제와 비교하였다. 제제 B의 제조에서는 세포를 70 μm 메쉬를 통해 현탁액 중에서 여과하였지만, 제제 A의 제조에서는 여과하지 않았다.

<표 7>

제제 A 및 제제 B의 비교

	제제 A	제제 B
세포 농도	$27 \pm 8 \times 10^6$ 세포/mL	$10 \pm 3 \times 10^6$ 세포/mL
벌크 부형제	플라즈마라이트	염수 중 5.5% 텍스트란 40
DMSO 농도	5% (v/v)	5% (v/v)
HSA 농도	10%	10%

유의한 세포 응집이 제제 A의 해동시에 관찰되었다. 후속적인 조사는, 수많은 파라미터, 예컨대 제제 배지의 조성 및 세포의 동결 농도가 세포 응집에 핵심적으로 기여하였음을 보여주었다. 최적화 연구를 수행하였고, 구체적으로 제제 B를 이들 세포 응집 효과를 감소 또는 제거하기 위해 고안하였다. 또한, 공정의 일부로서 70 μm 메쉬를 통한 세포 현탁액의 여과를 도입하여, 제제화 동안에 세포 현탁액을 보다 양호하게 제어하였다.

제제 중 세포 응집체를 정량화하기 위해, 필터 체류 검정을 개발 도구로서 고안하여, 제제 A 및 제제 B 둘 다에 의해 생성된 일련의 태반 세포 조성물 배치를 비교하기 위해 사용하였다. 이는 제제 B에서 세포 응집이 더이상 육안으로 신뢰할만하게 구별되지 않는 시점까지 감소되었기 때문에 특히 중요해졌다. 제제 A 및 제제 B의 대표적인 배치로부터 분석된 다중 샘플의 비교는 표 8에 도시된다. 상기 방법은 필터의 디지털 영상화에 의해 상이한 샘플로부터의 필터 상에 체류된 사전-염색된 세포 응집체를 정량화하고, 응집체에 의해 덮힌 필터의 면적 ("평균 면적")을 기록한다. 표 8에 도시된 바와 같이, 제제 B는 제제 A에 비해 일정하게 낮은 면적 범위 (응집체)를 가지며, 평균 차이는 400배이다. 데이터는 또한 제제 B에 대한 양호한 공정 제어 및 재현성을 보여준다. 생체내 연구에 사용된 두 가지 제제의 단리된 태반 세포 조성물 로트를 또한 표 16에 나타낸다. 제제 A에서 제제 B로의 차이는 정맥내 생체내 마우스 모델에서 최대 내약 용량 (MTD)이 대략 3배 개선된 것이었다 (데이터는 도시하지 않음).

[0370] <표 8>

제제 A 및 제제 B 중 해동후 응집체 형성

로트	백	필터	평균 면적 (px/MM)	Std Dev	CV	제제 (생체내 시험은 *로 표시)
1	2	13	97490	38369	0.39	제제 A
2	1	12	98629	33165	0.34	제제 A*
1	1	2	63	81	1.28	제제 B*
2	1	2	38	12	0.32	제제 B
3	1	2	1539	573	0.37	제제 B*
4	1	2	137	43	0.31	제제 B
5	3	6	125	162	1.29	제제 B
6	3	6	71	57	0.81	제제 B

[0371]

[0372]

설명: "백"은 해당 로트에 대해 해동되고 시험된 단리된 세포 조성물 백의 수를 나타내고; "필터"는 해당 로트에 대한 검정 복제물의 전체 수를 나타내고; "평균 면적"은 해당 로트에 대한 필터의 평균 면적 범위를 필터에 적용된 10⁶개 세포당 픽셀로 나타내고; "Std Dev" = 표준편차; "CV" = 변동계수를 나타낸다.

[0373]

6.3 실시예 3: 개선된 투여가능한 조성물의 특성화

[0374]

본 실시예는 HSA, 텍스트란 40, 및 DMSO를 포함하는 제약 제제의 추가의 특성화를 제공한다. 하기 기재된 하나 이상의 실험에서 이용된 방법은 다음과 같다:

[0375]

세포 생존율 평가: 생존율을 혈구계 또는 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터(Beckman Coulter), 캘리포니아주 풀러톤)를 이용하여 트리판 블루 배제 검정에 의해 평가하였다. 생존율은 전체 세포에 대한 생존 세포의 백분율로 표현하였다.

[0376]

세포 계수: 세포를 혈구계 또는 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러톤)를 이용하여 계수하였다. 세포 계수는 10⁶개 세포/mL (MM/mL)로 표현하였다.

[0377]

세포 응집: 세포 응집의 양은 세포를 염색하고 이를 70 μm 필터를 통해 여과시킴으로써 세포 응집의 양을 측정하는 필터 체류 검정 (FRA)을 이용하여 측정하였다. 70 μm 초과인 세포 응집체는 필터를 통과할 수 없으며, 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러톤)를 이용하는 영상 분석에 의해 정량화된다. 데이터는 부하된 10⁶개 세포당 픽셀 (px/MM)로서 표현된다.

[0378]

유세포 분석법: 세포를 유세포 분석법에 의해 세포 마커 CD10, CD34, CD105 및 CD200의 수준에 대해 평가하였다. 값은 특정 마커 또는 마커들의 조합에 대한 세포 양성 및/또는 음성의 백분율로서 표현된다.

[0379]

면역억제: 하기 기재된 제제에서 세포의 면역억제 활성화는 항원성 비드에 대한 T-세포 반응을 억제하는 세포의 능력을 측정하는 비드 T-세포 반응 (BTR) 검정을 이용하여 평가하였다.

[0380]

하기 실시예는 특정 표면 마커를 발현하는 단리된 태반 세포의 제제를 기재하며, 본원에 제시된 결과는 상기 방법 및 제제가 상이한 표면 마커를 발현하는 다른 세포, 예를 들어 포유동물 세포와 함께 사용될 수 있으며 그들과 상용성임을 나타낸다.

[0381]

6.3.1 DMSO 및 텍스트란:HSA 비의 특성화

[0382]

본 실시예는 세포 응집, 세포 생존율 및 회수율, 및 세포 표현형 및 기능성에 대한 다양한 농도의 HSA, 텍스트란, 및 DMSO, 및 다양한 비의 텍스트란:HSA의 효과를 기재한다.

[0383]

실험 조건

[0384]

세포 제제에 대한 세가지 성분 (HSA, 텍스트란 40 및 DMSO) 용액 공간을 도 1에서 삼원 다이어그램으로 도시된 조건 하에서 조사하였다. 실험 조건은 2개의 축을 따라 선택되었다: DMSO의 백분율은 상이하지만, 텍스트란:HSA의 비는 일정하기 유지시켜 시험한 한 축 (하기 제제 1-4 참조), 및 텍스트란:HSA의 비를 변화시켰지만, DMSO의 백분율을 일정하게 유지시킨 다른 축 (하기 제제 3, 5-8 참조).

[0385]

방법 및 물질

- [0386] 대략 12×10^6 개의 동결보존된 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 다능성 세포를 Nunc™ 10-트레이 셀 팩토리에 서 각각의 하기 제제에 대해 대략 1.2×10^8 세포로 확장시켰다. 세포를 실온에서 10 분 동안 0.25% 트립신 /EDTA와 함께 인큐베이션함으로써 수확하였다. 분리된 세포를 돌베코 변형 이글 배지 배지 (DMEM) 중 250 mL의 2% 태아 소 혈청 (FBS)을 함유하는 500 mL 원심분리 시험관에 전달하였다. 이어서, 세포를 소발(Sorvall) RC3BP 원심분리기에서 500 mL 시험관에서 1040 RPM 하에 원심분리하였다. 세포를 0.9% 식염수/5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 1420 RPM에서 10 분 동안 원심분리하고, 10 mL의 하기 8가지 제제 중 하나에 현탁시켰다 (제제 5-8의 경우 텍스트란:HSA 비는 "25% HSA"의 부피 분율 (VF HSA)의 단위로 제시 됨):
- [0387] 제제 1: 20% DMSO, 8.5% HSA, 4.6% 텍스트란 40
- [0388] 제제 2: 10% DMSO, 9.5% HSA, 5.2% 텍스트란 40
- [0389] 제제 3: 5% DMSO, 10% HSA, 5.5% 텍스트란 40 (VF HSA = 0.4) (대조군 제제)
- [0390] 제제 4: 0% DMSO, 10.5% HSA, 5.8% 텍스트란 40
- [0391] 제제 5: 5% DMSO, 0% HSA, 9.5% 텍스트란 40 (VF HSA = 0)
- [0392] 제제 6: 5% DMSO, 3.125% HSA, 8.25% 텍스트란 40 (VF HSA = 0.125)
- [0393] 제제 7: 5% DMSO, 16.88% HSA, 2.75% 텍스트란 40 (VF HSA = 0.675)
- [0394] 제제 8: 5% DMSO, 23.75% HSA, 0% 텍스트란 40 (VF HSA = 0.95)
- [0395] 상기 제제는 하기 원액으로부터 제조하였다: 100% DMSO (바이오닉 파마(Bioniche Pharma), 온타리오주 벨레 빌), 25% HSA (옥타파마(Octapharma), 뉴저지주 호보켄), 및 0.9% 염수 중 10% 텍스트란 40 (호스피라 (Hospira), 일리노이주 레이크 포레스트).
- [0396] 필터 채류 검정: 세포 응집을 필터 채류 검정을 이용하여 평가하였다. 세포 농도는 여과하기 전에 대략 1.2×10^7 개 세포/mL로 조정하였다. 필터 부하량 (단위 필터 면적당 세포의 수)은 대략 2.4×10^8 개 세포/필터로 일정 하게 유지하였다. 세포를 써모 제어 속도 동결기(Thermo control rate freezer)에서 7.5×10^6 개 세포/mL의 농 도에서 -70°C 로 동결보존시켰다. 사용하기 전에 세포를 해동시키고, 해동 직후에 샘플을 가공하였다. 희석되 지 않은 세포 현탁액의 $100 \mu\text{l}$ 샘플을 해동후 취하여, $900 \mu\text{l}$ 의 인산염 완충 염수 (PBS)로 희석하고, 세포 계수 를 바이-셀 세포 생존율 분석기 (벤크만 코울터, 캘리포니아주 플러톤)를 이용하여 이별식으로 수행하고, 10^6 개 세포당 픽셀의 수로서 기록하였다 (픽셀의 수가 많을수록 세포 응집체의 수가 더 많음을 나타냄).
- [0397] 세포 생존율 검정 (MTS 검정): 세포 생존율은 셀 타이터 96® 비-방사성 세포 증식 검정 (프로메가, 위스컨신주 매디슨)을 이용하여 측정하였다. 96-웰 플레이트 중의 세포를 제조자의 지시에 따라 (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨) (MTS) 및 페나진 메토술페이트 (PMS), 전자 커플링 시약과 합하였다. 이어서, MTS의 세포 생체 환원에 의해 생성된 포르마잔 생성물의 490 nm에서의 흡광도 를 측정하였다.
- [0398] 아넥신 웰 플레이트 검정: 해동된 세포를 아넥신-V 표지화 용액 (로슈(Roche), 카탈로그 번호 11 828 681 001) 중에 1×10^5 개 세포/mL의 농도로 희석하였다. $100 \mu\text{l}$ 의 세포 현탁액을 96 웰 플레이트에 삼별식으로 첨가하고, 빛에 노출시키지 않고 실온에서 15 분 동안 인큐베이션하였다. 15 분 후, 각각의 웰 내의 세개의 상 이한 위치를 명시야 및 형광 하에서 영상화하였다 (488 nm의 여기 파장, 및 파장 528 nm에서 검출). 자동화 세 포 계수 소프트웨어 (악시오비전(Axiovision))를 이용하여 영상당 전체 세포를 계수하였다. 아포토시스/괴사 세포 집단을 각각의 위치에서 아넥신 양성 세포를 계수하고 (형광 영상), 각각의 위치에서 전체 세포로 나눔으 로써 (명시야 영상) 측정하였다. 조건에 따른 아포토시스/괴사 세포 집단을 3개의 웰에서 3개의 상이한 웰 위 치에서 산출된 집단을 평균함으로써 측정하였다.
- [0399] 결과
- [0400] 세포 응집
- [0401] 도 2에 도시된 바와 같이 다양한 백분율의 DMSO, 예를 들어 0 내지 20% (제제 1-4)에 대한 세포 응집의 효과는

관찰되지 않았다. 모든 DMSO 조건은 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40 및 10% HSA를 포함하는 대조군 제제에 대해 관찰된 범위 내에서 응집의 수준을 나타내었다. HSA 및 텍스트란 농도를 또한 HSA 무함유 (HSA 부피 분율=0)에서 텍스트란 무함유 (HSA 부피 분율 = 0.95)에 이르는 범위의 조건으로 일정한 5% DMSO 농도 하에서 변화시켰다 (도 3). 0.125 내지 0.95의 25% HSA (최종 농도 각각 3.125% 내지 23.75% HSA)의 부피 분율에 대한 FRA 값은 최소의 응집을 나타내었다. HSA의 존재 하에서 관찰된 응집 수준은 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40 및 10% HSA를 포함하는 대조군 제제와 동일하거나 그보다 낮았다.

[0402] 해동후 생존율 및 회수율

[0403] 상이한 백분율의 DMSO (0, 5, 10 및 20%)에 대한 해동후 생존율 (도 4) 및 해동후 회수율 (도 5)을 트리판 블루 배제를 통해 바이-셀 자동화 세포 계수기를 이용하여 측정하여, 각각의 제제의 동결보호 능력을 평가하였다. 각각 0%, 5% 및 10% DMSO를 포함하는 제제의 경우 해동후 생존율이 90% 초과였고, 최대 값은 5% DMSO에서 관찰된 반면에, 20% DMSO를 포함하는 제제의 경우에는 생존율이 75% 미만이었다. 배양물 복구는 MTS 검정을 통해 측정하였다. 배양물 복구는 5% DMSO에서 최대인 것으로 관찰되었다 (도 6).

[0404] 상이한 부피 분율의 25% HSA, 즉, 상이한 비의 텍스트란:HSA에 대한 생존율 프로파일은 도 7-9에 도시된다. 트리판 블루 배제에 의해 측정되는 해동후 생존율은 다양한 부피 분율의 HSA에 대해 83.5% 내지 98.5% 범위의 값을 나타내었다 (도 7). 최대 값은 0.40 분율의 25% HSA, 즉, 10% HSA:5.5% 텍스트란 40에서 달성되었다. 해동후 세포 회수율 또한 계산하였으며, 값은 80% 내지 120% 범위이었으나, 0.2 이상의 부피 분율의 25% HSA를 포함하는 샘플은 100% 내지 120% 범위의 값을 나타내었다 (도 8). MTS 검정에 의해 측정된 배양물 복구 데이터는 해동후 생존율에서와 유사한 프로파일을 나타내었으며, 최대 값은 0.125 분율의 25% HSA, 즉, 3.13% HSA:8.25% 텍스트란 40에서 나타났다 (도 9).

[0405] 트리판 생존율은 아포토시스 세포를 검출하는 능력을 갖지 않는다. 그러나, 세포 크기 분포의 분석은 세포 건강에서의 변화를 나타낼 수 있다. DMSO의 부재 하에 동결된 세포로부터 해동된 세포 집단 중에서 아포토시스 세포의 백분율을 추정하기 위해, 해동후 웰 플레이트 아넥신 검정을 수행하였다. 검정에 의해, 0% DMSO 중에서 동결된 세포의 51%가 아포토시스인 것과는 대조적으로 5% DMSO 중에서 동결된 경우에는 15% 아포토시스이었다 (데이터는 도시하지 않음).

[0406] 표현형 및 기능성

[0407] 세포의 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 표현형을 유지하는 능력을 유세포 분석법에 의해 상이한 백분율의 성분에 대해 시험하였다. 대조군 제제 3 뿐만 아니라, 제제 2 (10% DMSO, 9.5% HSA, 5.2% 텍스트란 40), 제제 5 (5% DMSO, 0% HSA, 9.5% 텍스트란 40), 제제 6 (5% DMSO, 3.13% HSA, 8.25% 텍스트란 40) 및 제제 7 (5% DMSO, 16.88% HSA, 2.75% 텍스트란 40)로 제제화된 세포는 상기 표현형을 대략 유지하였고, 80.3% 내지 84.5%의 CD105⁺/CD200⁺ 값을 가졌다. 추가로, CD10⁺/CD34⁻ 발현은 각각의 제제에 대해 95% 초과였다. 조건 1, 4 및 8은 세포의 물리적 특성에서의 변화를 나타내는데, 이는 가능하게는 과편이 유세포 검정에 영향을 미쳤기 때문이다.

[0408] 세포 기능성은 항원성 비드에 대한 T 세포 반응을 억제하는 세포의 능력을 측정하는 비드 T 세포 반응 (BTR) 검정을 통해 평가하였다 (도 10). 제제 6 (5% DMSO, 3.13% HSA, 8.25% 텍스트란 40), 및 제제 7 (5% DMSO, 16.88% HSA, 2.75% 텍스트란 40)은 5% DMSO/10% HSA 및 5.5% 텍스트란 40을 포함하는 대조군 제제 3의 1 표준 편차 내에서 억제를 나타내었다. 이들 세 샘플은 가장 높은 트리판 블루 생존율 및 배양물 복구 값을 나타내었다. 다른 샘플들은 일반적으로 감소된 MTS와 상호 관련된 감소로 낮은 수준의 억제를 나타내었다.

[0409] 결론:

[0410] 0 내지 20% 범위의 DMSO 농도를 포함하는 제제는 5% DMSO, 10% HSA, 및 5.5% 텍스트란 40을 포함하는 대조군 제제에 대해 관찰된 것과 필적할만한 세포 응집 수준을 나타낸다. 그러나, 세포를 20% DMSO를 포함하는 제제 중에서 동결보존시킨 경우에는 세포 생존율이 감소되었고, 0% DMSO 중에서 동결된 세포는 5% DMSO 중에서 동결된 세포에 비해 해동후 유의하게 개선된 아포토시스를 나타내었다. 5% 및 10% DMSO를 포함하는 제제의 경우 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 표현형의 주목할만한 열화가 없었다. 따라서, 상기 결과는 5-10% DMSO를 포함하는 제제의 사용이 해동후 생존율을 유지하는데 바람직함을 입증한다.

[0411] 다양한 비의 HSA:텍스트란과 관련하여, 23.75% HSA, 0% 텍스트란을 포함하는 제제는 해동후 생존율 및 배양물 복구에서 약간의 감소를 나타낸 반면에, (i) 3.13% HSA 대 8.25% 텍스트란; (ii) 10% HSA 대 5.5%

텍스트란; 및 (iii) 16.88% HSA 대 2.75% 텍스트란의 비의 텍스트란:HSA를 포함하는 제제의 경우 해동후 생존율, 면역억제 활성 및 복구 값이 최고 높았다. 따라서, 이들 결과는 본원에 기재된 제제의 HSA:텍스트란 비가 10% HSA 및 5.5% 텍스트란 40의 비의 HSA:텍스트란을 포함하는 제제에 비해 세포 생존율, 해동후 세포 회수율, CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 표현형의 열화, 또는 면역억제 활성의 주목할만한 감소 없이 정의된 범위 내에서 달라질 수 있음을 입증한다. 본원에 제시된 데이터는 적어도 약 6:1 HSA:텍스트란 내지 약 1:2.6 HSA:텍스트란의 HSA:텍스트란 비의 작업 범위를 뒷받침한다.

[0412] 6.3.2 동결 세포 밀도의 효과

[0413] 본 실시예는 세포 생존율; CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 표현형; 세포 응집; 및 세포의 면역억제 기능성에 대한 1 - 40 x 10⁶개 세포/mL 범위의 세포 농도, 예를 들어 동결 세포 밀도의 효과를 기재한다.

[0414] 방법 및 물질

[0415] CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기 세포를 3 일 동안 배양하고, 수확하고, 원심분리하고, 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA를 포함하는 제제 중에 약 3.5 x 10⁷개 세포/mL의 농도로 재현탁시키고, 70 μm 필터를 통해 여과하였다. 여과후 세포를 상기 제제로 계열 희석하여, 멸균 백 중에 하기 세포 밀도를 포함하는 세포 샘플을 생성하였다: 1 x 10⁶개 세포/mL, 7.5 x 10⁶개 세포/mL, 15 x 10⁶개 세포/mL, 및 20 x 10⁶개 세포/mL. 세포를 별도로 수확하여, 4.0 x 10⁷개 세포/mL를 포함하는 별도의 샘플을 생성하였다. 4.0 x 10⁷개 세포/mL 샘플의 세포를 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA를 포함하는 5 mL의 제제 중에 약 4.6 x 10⁷개 세포/mL의 농도로 재현탁시키고, 70 μm 필터를 통해 여과하고, 상기 제제를 이용하여 20 mL의 백에서 4.0 x 10⁷개 세포/mL로 희석하였다. 4.0 x 10⁷개 세포/mL 샘플을 갖는 20 mL의 백 1개, 1 x 10⁶개 세포/mL, 7.5 x 10⁶개 세포/mL, 15 x 10⁶개 세포/mL, 및 20 x 10⁶개 세포/mL 샘플을 갖는 20 mL의 백 2개씩, 및 각각의 샘플을 갖는 280 μL의 바이알 5개를 제어된 속도 동결기를 이용하여 -70°C에서 동결시켰다. 이들 샘플을 이후 해동시키고, (1) 세포 계수; (2) 생존율; (3) 표현형; (4) 세포 응집; 및 (5) 효능을 비롯한 다양한 세포 특징에 대한 동결 농도의 효과를 측정하기 위해 분석하였다.

[0416] 필터 체류 검정: 세포 응집을 필터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 세포 농도는 여과하기 전에 대략 1.2 x 10⁷개 세포/mL로 조정하였다. 필터 부하량 (단위 필터 면적당 세포의 수)은 대략 2.4 x 10⁸개 세포/필터로 일정하게 유지하였다. 세포를 써모 제어 속도 동결기에서 7.5 x 10⁶개 세포/mL의 농도에서 -70°C로 동결보존시켰다. 사용하기 전에 세포를 해동시키고, 해동 직후에 샘플을 가공하였다. 희석되지 않은 세포 현탁액의 100 μL 샘플을 해동후 취하여, 900 μL의 인산염 완충 염수 (PBS)로 희석하고, 세포 계수를 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 이벌식으로 수행하고, 10⁶개 세포당 픽셀의 수로서 기록하였다 (픽셀의 수가 많을수록 세포 응집체의 수가 더 많음을 나타냄).

[0417] 결과:

[0418] 세포 계수/생존율

[0419] 각각의 해동된 백으로부터의 1 mL의 샘플 1 내지 2개를 제조자의 지시에 따라 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 생존 세포 계수 및 생존율을 측정하기 위해 취하였다. 평균 생존율은 모든 조건의 경우 약 97%로 일정하게 유지되었다. 생존 세포 계수는 초기 동결 농도에 상응하였다 (하기 표 9 참조).

[0420] <표 9>

바이-셀 생존 세포 농도 및 생존율

동결 농도	세포 계수 ($\times 10^6$) 세포 /mL	생존율 (%)
1×10^6 /mL	1.20	98.70
7.5×10^6 /mL	8.32	97.12
15×10^6 /mL	16.47	97.33
20×10^6 /mL	20.80	97.61
40×10^6 /mL	39.92	96.71

[0421]

[0422] 표현형

[0423] 세포의 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 표현형을 유지하는 능력을 유세포 분석법에 의해 상이한 세포 밀도에 대해 시험하였다. 표 10에 제시된 바와 같이, 상기 표현형은 상이한 동결 농도 사이에서 변하지 않았다. 모든 조건에서 CD200⁺/CD105⁺ 발현은 대략 86%로 유지되었고, CD34⁻/CD10⁺ 발현은 대략 99%로 유지되었다.

[0424] <표 10>

CD200⁺/CD105⁺ 및 CD34⁻/CD10⁺ 발현

동결 농도	CD200 ⁺ /CD105 ⁺	CD34 ⁻ /CD10 ⁺
1×10^6 /mL	87.3	98.2
7.5×10^6 /mL	86.7	99.1
15×10^6 /mL	85.8	99.1
20×10^6 /mL	85.5	98.9
40×10^6 /mL	86.3	98.5
음성 대조군	69.4	98.5
양성 대조군	91.1	98.8

[0425]

[0426] 세포 응집

[0427] 각각의 조건의 복제물을 필터 채류 검정에 의해 분석하여, 상이한 동결 농도에서의 세포 응집의 정도를 측정하였다 (도 11). 검정의 복제물은 1×10^6 개 세포/mL, 7.5×10^6 개 세포/mL, 15×10^6 개 세포/mL 및 20×10^6 개 세포/mL 샘플에 대해 수행하였다. 1개의 세포 샘플을 40×10^6 개 세포/mL 샘플에 대해 이별식으로 검정하였다. 40×10^6 개 세포/mL 샘플은 시험한 모든 세포 밀도에 대해 가장 높은 세포 응집 신호를 나타내었다. 다른 모든 샘플들은 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 중에서 7.5×10^6 개 세포/mL로 미리 동결보존시킨 대조군 샘플에서 관찰된 응집의 양과 같거나 그보다 적었다.

[0428] 추가의 별도의 세포 응집 검정을 수행하여, 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA를 포함하는 제제 중에 7.5×10^6 /mL 및 20×10^6 /mL로 동결보존시킨 세포를 시험하였다 (도 12). 추가의 데이터는 20×10^6 /mL에서 증가된 신호를 보였으며, 이는 20×10^6 /mL에서 동결된 세포가 가변적인 세포 응집 결과를 제공함을 나타낸다. 그 결과, 상기 농도 또는 그 이상에서 동결된 세포는 응집에 대해 증가된 잠재력을 갖는다. 이들 데이터는, 응집이 세포 농도를 증가시키고, 20×10^6 mL의 동결 세포 밀도가 7.5×10^6 /mL의 동결 세포 밀도에 비해 증가된 세포 응집을 나타낼 수 있음을 입증한다.

[0429] 기능성

[0430] 각각의 조건으로부터의 바이알을 혼합 백혈구 반응 (MLR) 및 비드 T-세포 반응 (BTR) 분석을 위해 사용하여, CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 증식의 억제로서 측정되는 다양한 동결 세포 밀도에서의 세포 면역조절 특성을 평가하였다. MLR 결과는 15×10^6 개 세포/mL 및 40×10^6 개 세포/mL에서 CD4 및 CD8 억제의 감소를 나타내는 반

면에, 20×10^6 개 세포/mL에서의 억제율은 1×10^6 개 세포/mL 및 7.5×10^6 개 세포/mL에서 관찰된 것과 필적할만 하였다. 그러나, BTR 결과는 20×10^6 개 세포/mL 및 40×10^6 개 세포/mL에서 CD4 및 CD8 억제율의 감소를 나타내었다.

[0431] <표 11>

MLR 및 BTR 결과 - 태반 줄기 세포의 부재 하에서의 T 세포 반응성과 비교한 T 세포 반응성 백분율

샘플	MLR		BTR	
	CD4 억제율	CD8 억제율	CD4 억제율	CD8 억제율
1×10^6 /mL	63	64	63	62
7.5×10^6 /mL	63	64	63	62
15×10^6 /mL	49	46	61	64
20×10^6 /mL	65	65	36	39
40×10^6 /mL	40	45	33	38

[0432]

[0433] 결론:

[0434] 상기 결과는, 세포 생존율 및 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 표현형이 동결 세포 밀도의 함수로서 변화하지 않는다는 것을 입증한다. 그러나, 20×10^6 개 세포/mL의 밀도에서 동결보존된 세포는 세포 응집에서의 가변적인 증가 및 면역억제 활성에서의 가변적인 감소를 입증하는 반면에, 40×10^6 개 세포/mL의 밀도에서 동결보존된 세포는 세포 응집에서의 일정한 증가 및 면역억제 활성에서의 일정한 감소를 나타내었다. 따라서, 세포를 세포 생존율에서 및 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 표현형을 디스플레이하는 세포의 수에서 주목할만한 감소 없이 예를 들어 40×10^6 개 세포/mL까지의 밀도에서 본원에 기재된 제제로 제제화할 수 있는 반면에, $1.0 - 15 \times 10^6$ 개 세포/mL 범위의 동결 세포 밀도가 해동시 세포 응집을 최소화하는데 바람직하다.

[0435] 6.3.3 텍스트란의 분자량의 효과

[0436] 본 실시예는 세포 응집, 생존율, 회수율, $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 표현형 및 기능성에 대한 다양한 분자량의 텍스트란, 예를 들어 텍스트란 1 (MW=1000), 텍스트란 40 (MW=40,000) 및 텍스트란 70 (MW=70,000)의 효과를 기재한다.

[0437] 물질 및 방법

[0438] 12×10^6 개의 동결보존된 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 태반 다능성 세포를 Nunc™ 10-트레이 셀 팩토리에 각각의 하기 제제에 대해 대략 1.2×10^8 세포로 확장시켰다. 세포를 실온에서 10 분 동안 0.25% 트립신/EDTA와 함께 인큐베이션함으로써 수확하였다. 분리된 세포를 돌베코 변형 이글 배지 배지 (DMEM) 중 250 mL의 2% 태아 소 혈청 (FBS)을 함유하는 500 mL 원심분리 시험관에 전달하였다. 이어서, 세포를 소말 RC3BP 원심분리기에서 500 mL 시험관에서 1040 RPM 하에 원심분리하였다. 세포를 0.9% 식염수/5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 1420 RPM에서 10 분 동안 원심분리하고, 10 mL의 하기 제제에 현탁시켰다:

[0439] 제제 1: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40 (호스피라, 일리노이주 레이크 포레스트), 10% HSA (대조군)

[0440] 제제 2: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 1 (파마코스모스(Pharmacosmos)), 10% HSA

[0441] 제제 3: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40 (파마코스모스), 10% HSA

[0442] 제제 4: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 70 (파마코스모스), 10% HSA

[0443] 필터 체류 검정: 세포 응집을 필터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 세포 농도는 여과하기 전에 대략 1.2×10^7 개 세포/mL로 조정하였다. 필터 부하량 (단위 필터 면적당 세포의 수)은 대략 2.4×10^8 개 세포/필터로 일정하게 유지하였다. 세포를 씨모 제어 속도 동결기에서 7.5×10^6 개 세포/mL의 농도에서 -70°C 로

동결보존시켰다. 사용하기 전에 세포를 해동시키고, 해동 직후에 샘플을 가공하였다. 희석되지 않은 세포 현탁액의 100 μ l 샘플을 해동후 취하여, 900 μ l의 인산염 완충 염수 (PBS)로 희석하고, 세포 계수를 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 이별식으로 수행하였다.

[0444] 결과:

[0445] 세포 응집

[0446] 각각의 제제 내의 세포 응집을 필터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 제제 2 (텍스트란 1), 제제 3 (텍스트란 40) 및 제제 4 (텍스트란 70)는 대조군 제제 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 및 10% HSA와 동등하거나 그보다 적은 세포 응집률을 입증하였다 (도 13).

[0447] 생존율 및 회수율

[0448] 텍스트란 1, 텍스트란 40 또는 텍스트란 70을 포함하는 샘플에 대한 해동후 생존율은 96.0% 내지 97.7% 생존율의 범위였다 (도 14). 유사하게, 해동후 회수율은 대조군 제제와 유사하였으며, 세포 생존율은 대조군 제제의 92% 내지 109%이었다 (도 15).

[0449] 표현형 및 기능성

[0450] 세포의 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 표현형을 유지하는 능력을 유세포 분석법에 의해 상이한 텍스트란 분자량에 대해 시험하였고, 세포 면역억제 능력을 BTR 검정으로 시험하였다. 시험한 모든 제제에 대한 CD200⁺/CD105⁺ 발현은 89.1% 내지 91.6%의 범위였고, CD34⁻/CD10⁺ 발현은 모든 조건에 대해 95% 초과였다 (도 16). 게다가, 상이한 텍스트란 분자량에 대한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포 억제제 텍스트란 40을 포함하는 표준 대조군 제제의 4가지 상이한 실험 복제물로부터 유래된 예상된 값의 1 표준 편차 내에 있었다 (도 17).

[0451] 결론:

[0452] 이들 결과는, 본원에 기재된 제제에서 텍스트란 1 또는 텍스트란 70이 세포 응집, 생존율, 회수율, 표현형 또는 면역억제 능력에 영향을 미치지 않고 텍스트란 40을 대체할 수 있음을 입증한다.

[0453] 6.3.4 상이한 폴리사카라이드의 효과

[0454] 본 실시예는 세포 생존율 및 증식에 대한 세포 제제 중 텍스트란 40 이외의 폴리사카라이드의 효과를 기재한다.

[0455] 물질 및 방법

[0456] 12 x 10⁶개의 동결보존된 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 다능성 세포를 Nunc™ 10-트레이 셀 팩토리에서 각각의 하기 제제에 대해 대략 1.2 x 10⁸ 세포로 확장시켰다. 세포를 실온에서 10 분 동안 0.25% 트립신/EDTA와 함께 인큐베이션함으로써 수확하였다. 분리된 세포를 둘베코 변형 이글 배지 배지 (DMEM) 중 250 mL의 2% 태아 소 혈청 (FBS)을 함유하는 500 mL 원심분리 시험관에 전달하였다. 이어서, 세포를 소발 RC3BP 원심분리기에서 500 mL 시험관에서 1040 RPM 하에 원심분리하였다. 세포를 0.9% 식염수/5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 1420 RPM에서 10 분 동안 원심분리하고, 10 mL의 하기 제제에 현탁시켰다:

[0457] 제제 1: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA (대조군)

[0458] 제제 2: 5% DMSO, 5.5% 말토텍스트린, 10% HSA

[0459] 제제 3: 5% DMSO, 5.5% 수크로스, 10% HSA

[0460] 제제 4: 5% DMSO, 5.5% 트레할로스, 10% HSA

[0461] 제제 5: 5% DMSO, 55USP/mL 헤파린, 10% HSA

[0462] 제제 6: 5% DMSO, 3.3% 헤타스타치, 10% HSA

[0463] 제제 7: 5% DMSO, 5.5% 글리코젠, 10% HSA

[0464] 필터 체류 검정: 세포 응집을 필터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 세포 농도는 여과하기 전에 대략 1.2 x 10⁷ 개 세포/mL로 조정하였다. 필터 부하량 (단위 필터 면적당 세포의 수)은 대략 2.4 x 10⁸ 개 세포/필터로 일정

하게 유지하였다. 세포를 써모 제어 속도 동결기에서 -70°C 로 동결보존시켰다. 사용하기 전에 세포를 해동시키고, 해동 직후에 샘플을 가공하였다. 희석되지 않은 세포 현탁액의 $100\ \mu\text{l}$ 샘플을 해동후 취하여, $900\ \mu\text{l}$ 의 인산염 완충 염수 (PBS)로 희석하고, 세포 계수를 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 이별식으로 수행하였다.

[0465] 결과:

[0466] 세포 응집

[0467] 각각의 제제 내의 세포 응집을 펠터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 제제 2-7은 대조군 제제 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 및 10% HSA와 동등하거나 그보다 적은 세포 응집물을 생성하는 것으로 입증되었다 (도 18). 트레할로스를 포함하는 제제 4, 헤파린을 포함하는 제제 5, 및 글리코젠을 포함하는 제제 7은 대조군 제제보다 실질적으로 적은 세포 응집률을 입증하였다.

[0468] 해동후 생존율 및 회수율

[0469] 해동후 생존율, 생존 세포 회수율 및 세포 크기 데이터를 각각의 제제 1-7에 대해 평가하여, 제제의 동결보호 능력을 평가하였다. 해동후 생존율은 트리판 블루 배제에 의해 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 평가하였다. 해동후 생존율은 95.2% 내지 98.6% 범위였고, 수크로스 및 글리코젠의 경우에는 보다 낮은 하한을 나타내었다 (도 19). 대조군 텍스트란 제제는 98%의 세포 생존율을 나타내었다. 해동후 생존 세포 회수율을 계산하여 동결/해동 공정에 대한 세포 손실을 이해하였고, 상이한 폴리사카라이드에 대해 84% 내지 115% 범위의 값을 나타내었다 (도 20).

[0470] 표현형 및 기능성

[0471] 세포의 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$, $\text{CD}200^+$ 표현형을 유지하는 능력을 유세포 분석법에 의해 상이한 폴리사카라이드에 대해 시험하였다. 대조군 제제 1 뿐만 아니라 제제 2-4 및 6으로 제제화된 세포는 상기 표현형을 대략 유지하였고, 89.4% 내지 92.9%의 $\text{CD}105^+/\text{CD}200^+$ 이었다. $\text{CD}10^+/\text{CD}34^-$ 발현은 각각의 제제에 대해 95% 초과였다. 헤파린 중에서 동결된 세포는 85.4%의 $\text{CD}105^+/\text{CD}200^+$ 표현형을 유지하였다 (도 21).

[0472] 세포 기능성은 항원성 비드에 대한 T 세포 반응을 억제하는 세포의 능력을 측정하는 비드 T 세포 반응 (BTR) 검정을 통해 평가하였다. 수크로스로 제제화된 세포는, 텍스트란 40을 포함하는 표준 대조군 제제의 4가지 상이한 실험 복제물로부터 유래된 예상된 값의 1 표준 편차 내인 것과 비교해서 감소된 T-세포 억제를 나타내었다 (도 22). 다른 폴리사카라이드의 경우, CD4 및 CD8 T-세포 억제는 예상된 값의 1 표준 편차 내에 있었다.

[0473] 결론:

[0474] 세포 응집, 해동후 생존율, 해동후 세포 회수율 및 표현형의 유지와 관련하여, 말토텍스트란, 트레할로스 및 헤타스타치를 포함하는 제제의 사용은 텍스트란 40 제제의 사용과 대략 동일한 특징을 갖는 태반 세포 집단을 나타내었다. 따라서, 수크로스, 헤파린 또는 글리코젠을 포함하는 제제를 사용하여 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$, $\text{CD}200^+$ 태반 줄기 세포를 제제화할 수 있으나, 텍스트란 40, 말토텍스트란, 트레할로스 또는 헤타스타치를 포함하는 제제가 바람직하다.

[0475] 6.3.5 HSA의 단백질 대체의 효과

[0476] 본 실시예는 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 5% DMSO 제제 중의 인간 혈청 알부민 농도를 감소시킬 수 있고, HSA를 소 혈청 알부민 또는 태아 소 혈청으로 대체할 수 있음을 입증한다.

[0477] 제제 1 (F1)은 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 및 5% DMSO로 이루어진다. F1 내에서 HSA의 역할을 이해하기 위해, 그리고 세포 조성물에 대한 그의 영향을 이해하기 위해, 인간 혈청 알부민과 유사한 단백질, 즉, 소 혈청 알부민 (BSA) 및 태아 소 혈청 (FBS)을 함유하는 대체 제제를 시험하였다.

[0478] 물질 및 방법

[0479] 12×10^6 개의 동결보존된 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$, $\text{CD}200^+$ 태반 다능성 세포를 Nunc™ 10-트레이 셀 팩토리에 각각의 하기 제제에 대해 대략 1.2×10^8 세포로 확장시켰다. 세포를 실온에서 10 분 동안 0.25% 트립신/EDTA와 함께 인큐베이션함으로써 수확하였다. 분리된 세포를 둘베코 변형 이글 배지 배지 (DMEM) 중 250 mL의 2% 태

아 소 혈청 (FBS)을 함유하는 500 mL 원심분리 시험관에 전달하였다. 이어서, 세포를 소발 RC3BP 원심분리기에 서 500 mL 시험관에서 1040 RPM 하에 원심분리하였다. 세포를 0.9% 식염수/5% 텍스트란 40 용액 중에 재현탁 시켰다. 이어서, 세포를 1420 RPM에서 10 분 동안 원심분리하고, 10 mL의 하기 제제에 현탁시켰다:

[0480] 제제 1: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA (대조군)

[0481] 제제 2: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 4% HSA

[0482] 제제 3: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% BSA

[0483] 제제 4: 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% FBS

[0484] 필터 체류 검정: 세포 응집을 필터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 세포 농도는 여과하기 전에 대략 1.2×10^7 개 세포/mL로 조정하였다. 필터 부하량 (단위 필터 면적당 세포의 수)은 대략 2.4×10^8 개 세포/필터로 일정 하게 유지하였다. 세포를 써모 제어 속도 동결기에서 -70°C 로 동결보존시켰다. 사용하기 전에 세포를 해동시 키고, 해동 직후에 샘플을 가공하였다. 희석되지 않은 세포 현탁액의 100 μl 샘플을 해동후 취하여, 900 μl 의 인산염 완충 염수 (PBS)로 희석하고, 세포 계수를 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)를 이용하여 이별식으로 수행하였다.

[0485] 결과:

[0486] 세포 응집

[0487] 필터 체류 검정 (FRA)에 의해 측정된 세포 응집은 모든 조건의 경우 100 픽셀/ m^2 이거나 그 미만이었다 (도 23). 그러나, 10% HSA 및 10% BSA는 4% HSA 및 10% FBS에 비해 구별가능하게 낮은 응집체를 생성하는 것으로 보 였다.

[0488] 각각의 용액의 동결보호 능력을 이해하기 위해, 해동후 생존율, 회수율 및 세포 크기를 트리판 블루 배제를 이 용하여 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 코울터, 캘리포니아주 풀러튼)에서 평가하였다. 각각의 조건에 대 한 해동후 생존율은 검정 변이 내에 있었고, 95% 내지 98% 생존율의 범위였다 (도 24). 유사하게, 해동후 세 포 회수율은 10% HSA 대조군과 유사하였고, 100 내지 127% 범위의 값을 나타내었다 (도 25).

[0489] 표현형 및 기능성

[0490] 세포의 $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$, $\text{CD}200^+$ 표현형을 유지하는 능력을 유세포 분석법에 의해 상이한 제제에 대해 평가 하였다. (도 26 및 27). 대조군 10% HSA 제제 뿐만 아니라 제제 2-4로 제제화된 세포는 상기 표현형을 대략 유지하였고, 시험된 세포의 88.2% 내지 93.5% 범위의 값을 나타내었다. $\text{CD}10^+/\text{CD}34^-$ 발현은 각각의 제제에 대 해 95% 초과였다.

[0491] 세포 기능성은 비드 T 세포 반응 검정을 통해 평가하였다. 다른 조건과 비교해서, $\text{CD}4$ 및 $\text{CD}8$ T-세포의 억제 는 세포를 FBS로 제제화하였을 때 상승하였으며, 그 값은 10% HSA를 포함하는 표준 대조군 제제의 4가지 상이한 실험 복제물로부터 유래된 예상된 값의 1.5 표준 편차 내에 있었다 (도 28). 다른 모든 조건에 대해서는 예상 된 값의 1 표준 편차 내에 있었다.

[0492] 결론:

[0493] 상기 결과는, 4% HSA, 10% BSA, 또는 10% FBS가 세포 생존율, 해동후 세포 회수율, $\text{CD}10^+$, $\text{CD}34^-$, $\text{CD}105^+$, $\text{CD}200^+$ 표현형의 열화, 또는 면역억제 활성의 주목할만한 감소 없이 10% HSA를 대체할 수 있음을 입증한다. 따라서, 적어도 약 4% 내지 약 10% 범위의 HSA, BSA 및/또는 FBS가 본원에 기재된 제제에 대해 특히 적합하다.

[0494] 6.3.6 상이한 세포 유형과의 상용성

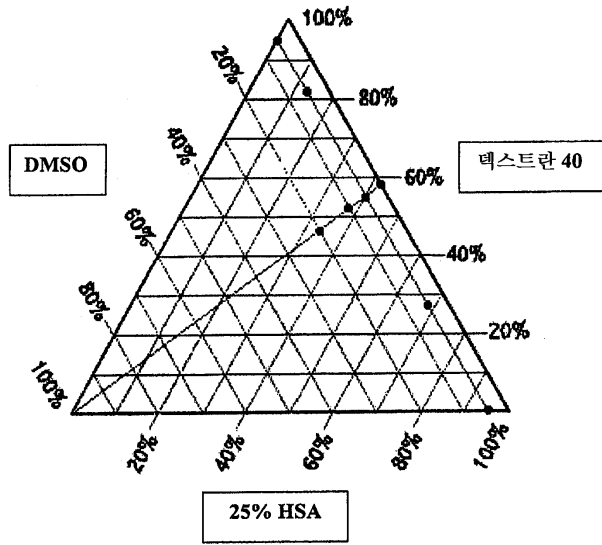
[0495] 본 실시예는 골수-유래 중간엽 줄기 세포 및 천연 킬러 세포가 태반 다능성 세포와 동일한 방식으로 제제화될 수 있음을 입증한다. 따라서, 본 실시예는 태반 다능성 세포 뿐만 아니라 다른 세포가 본원에 제시된 방식으로 제제화될 수 있음을 보여준다.

[0496] 방법 및 물질:

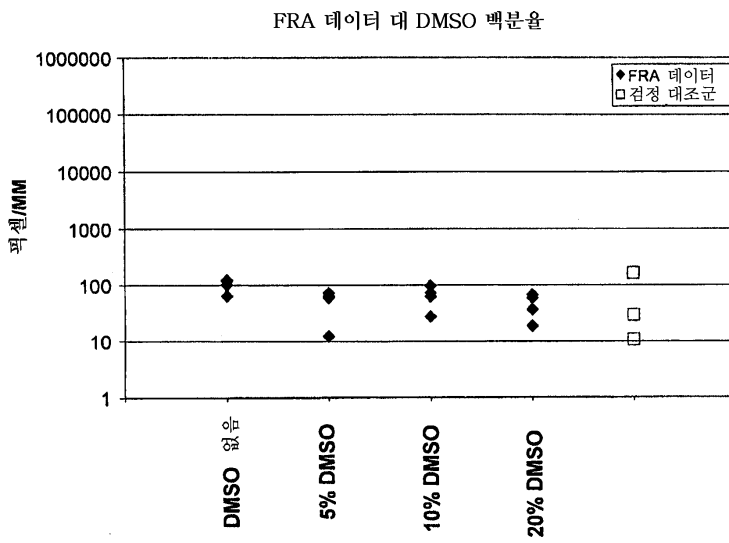
- [0497] 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (BMMSC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 하기 제제를 이용하여 확장 및 수확하였다:
- [0498] F1: 세포를 3 일 동안 배양한 후, 수집하고, 세포를 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA 중에 재현탁시키고, 세포를 70 μm 필터로 여과하고, 세포를 대략 7.5×10^6 개 세포/mL에서 동결보존시킴; 및
- [0499] F2: 세포를 4 일 동안 배양한 후, 수집하고, 세포를 5% DMSO 및 10% HSA를 포함하는 플라즈마라이트 A 중에 재현탁시킴.
- [0500] 세포를 제어된 속도 동결기를 이용하여 -70°C 에서 동결시켰다. BMMSC를 F2 제제의 경우 20 mL의 백에서 및 F1 제제의 경우 10 mL의 백에서 동결보존시키고, CD3^- , CD56^+ NK 세포를 F2 제제의 경우 10 mL의 백에서 및 F1 제제의 경우 1.5 mL의 바이알에서 동결보존시켰다. 이들 샘플을 이후 해동시키고, 분석하여, 세포 특성에 대한 동결 제제의 효과를 측정하였다.
- [0501] **필터 체류 검정:** 세포 응집을 필터 체류 검정을 이용하여 평가하였다. 세포 농도는 여과하기 전에 대략 1.2×10^7 개 세포/mL로 조정하였다. 필터 부하량 (단위 필터 면적당 세포의 수)은 대략 2.4×10^8 개 세포/필터로 일정하게 유지하였다. 세포를 세포 제어 속도 동결기에서 -70°C 로 동결보존시켰다. 사용하기 전에 세포를 해동시키고, 해동 직후에 샘플을 가공하였다. 회석되지 않은 세포 현탁액의 100 μl 샘플을 해동후 취하여, 900 μl 의 인산염 완충 염수 (PBS)로 회석하고, 세포 계수를 바이-셀 세포 생존율 분석기 (베크만 쿨터, 캘리포니아주 플러톤)를 이용하여 이별식으로 수행하였다.
- [0502] **결과**
- [0503] **생존율**
- [0504] 해동후 샘플을 사용하여 상이한 조건 하에서 동결된 세포의 생존율을 측정하였다. BMMSC 및 NK 세포의 생존율은 동결 조건에 의해 유의한 영향을 받지 않았다.
- [0505] **표현형**
- [0506] NK 마커를 검정하여, NK 표현형 (CD3^- , CD56^+)에 대한 F1 및 F2 제제의 효과를 측정하였다. 사용된 상기 두 제제는 NK 표현형을 디스플레이하는 NK 세포의 백분율에 유의한 영향을 미치지 않았다. BMMSC는 또한 CD10, CD34, CD44, CD45, CD90, CD98, CD105, CD117, CD166, CD200, 판-사이토케라틴, 및 KDR의 발현에 대해 분석하였다. 이들 마커의 발현 또는 발현 결여는 F1 또는 F2 제제로 제제화된 BMMSC에서 유의하게 달라지지 않았다.
- [0507] **세포 응집**
- [0508] 필터 체류 검정에서, 각각의 BMMSC 제제의 2개의 복제물, 및 NK 제제의 1개의 검정 복제물을 수행하였다. F1 제제는 BMMSC 및 NK 세포 둘 다에 대해 F2 제제보다 유의하게 낮은 응집체를 생성하였으나, 제제 F2의 효과는 NK 세포보다 BMMSC에 대해 더욱 현저하였다 (도 29).
- [0509] **결론:**
- [0510] 상기 결과는 골수-유래 중간엽 줄기 세포 및 천연 킬러 세포가 5% DMSO, 5.5% 텍스트란 40, 10% HSA에서 성공적으로 제제화될 수 있으며, 세포 응집, 생존율 및 표현형 유지는 동일한 제제 중의 CD10^+ , CD34^- , CD105^+ , CD200^+ 태반 다능성 세포와 유사하다는 것을 입증한다. 또한, 태반 다능성 세포의 경우, BMMSC 및 NK 세포의 플라즈마라이트-함유 제제가 유의하게 높은 세포 응집률을 보여주며, 따라서 텍스트란-함유 제제가 바람직하다.
- [0511] **등가물:**
- [0512] 본원에 개시된 조성물 및 방법은 본원에 기재된 구체적 실시양태에 의해 범위가 제한되어서는 않된다. 사실상, 기재된 조성물 및 방법 뿐만 아니라 그의 다양한 변형이 상기 기재 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 자명해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.
- [0513] 다양한 공보, 특허 및 특허 출원이 본원에 인용되며, 이들의 개시내용은 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

도면

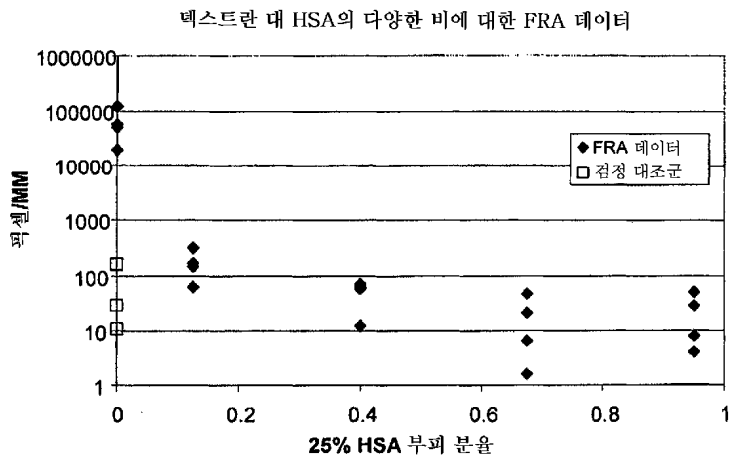
도면1



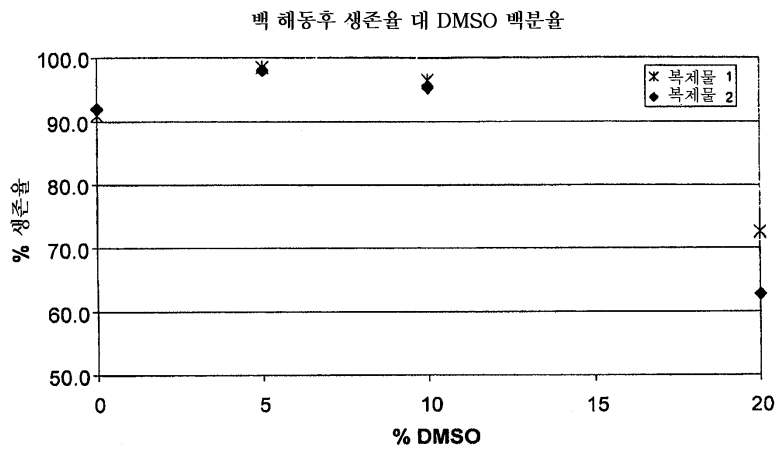
도면2



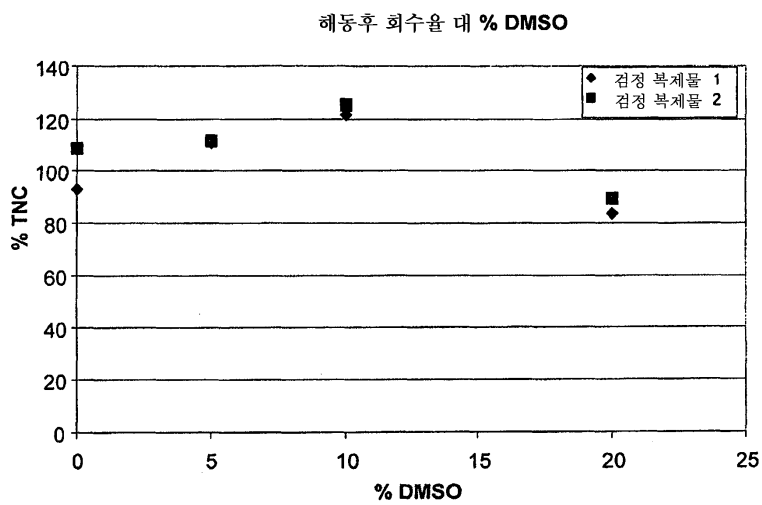
도면3



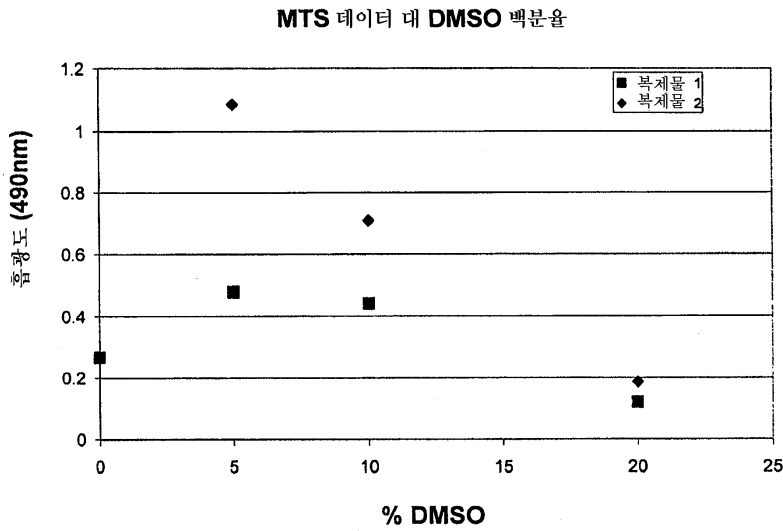
도면4



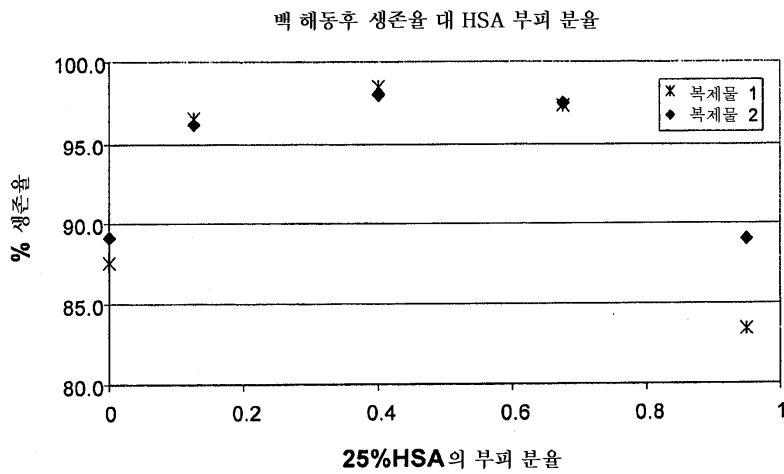
도면5



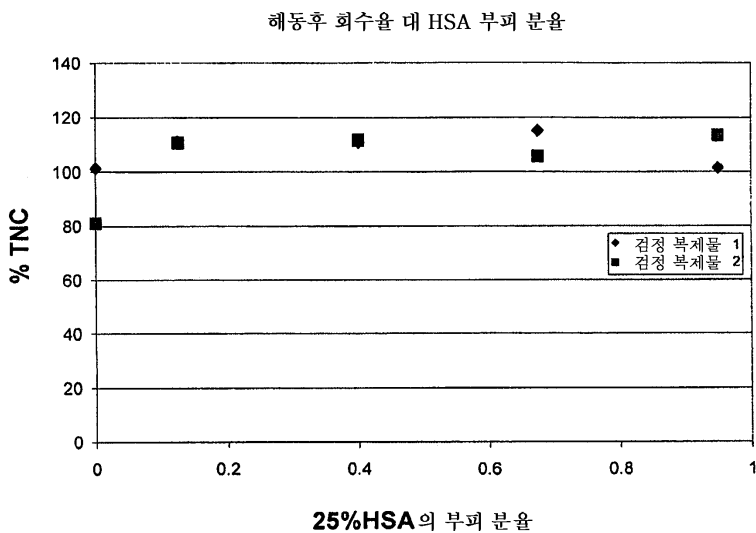
도면6



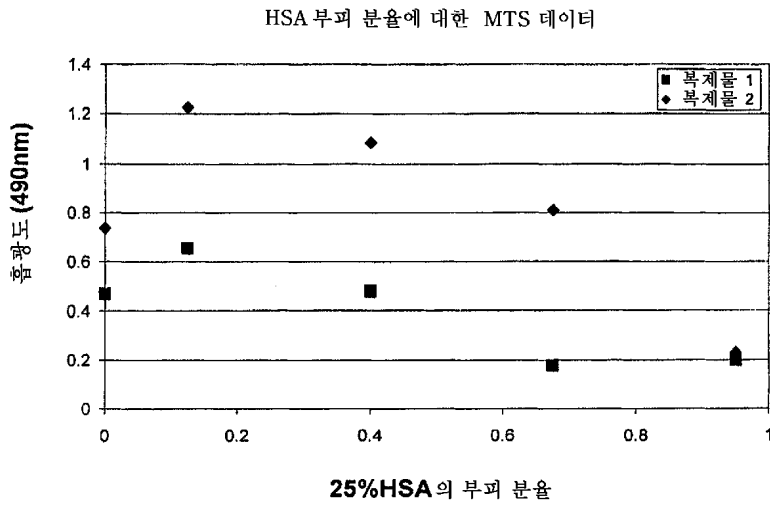
도면7



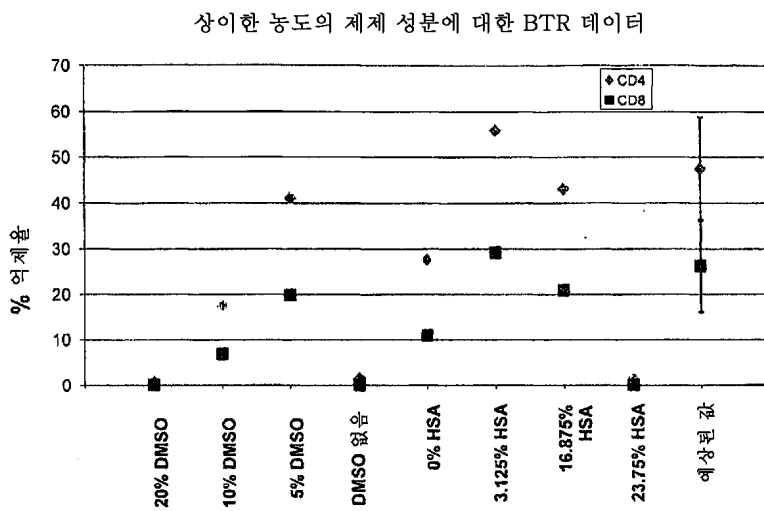
도면8



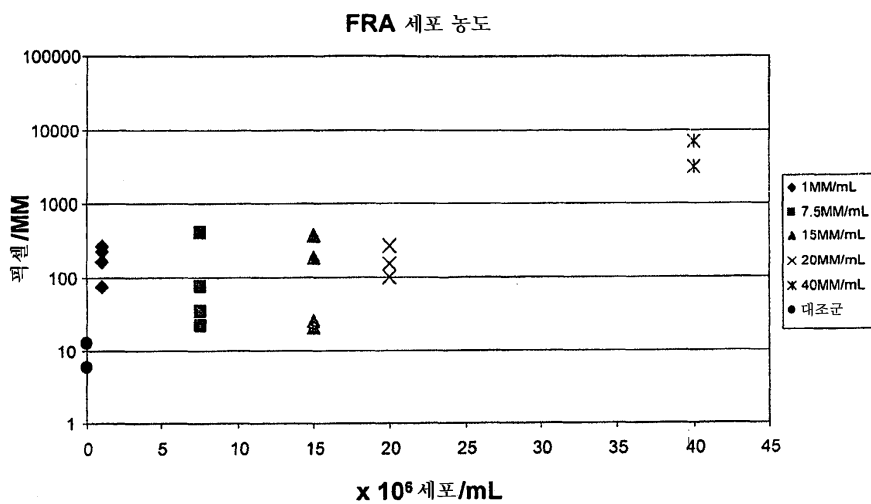
도면9



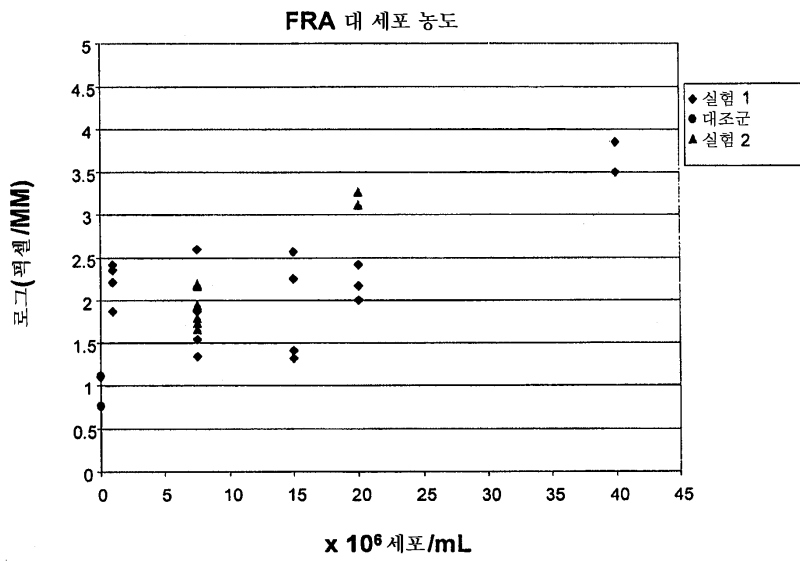
도면10



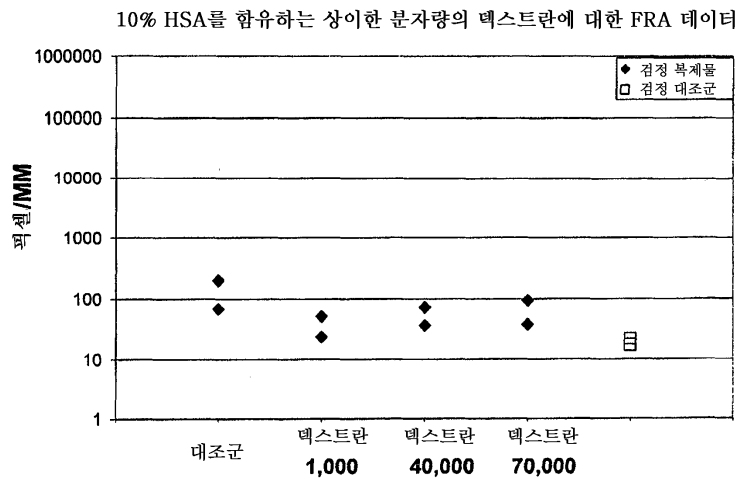
도면11



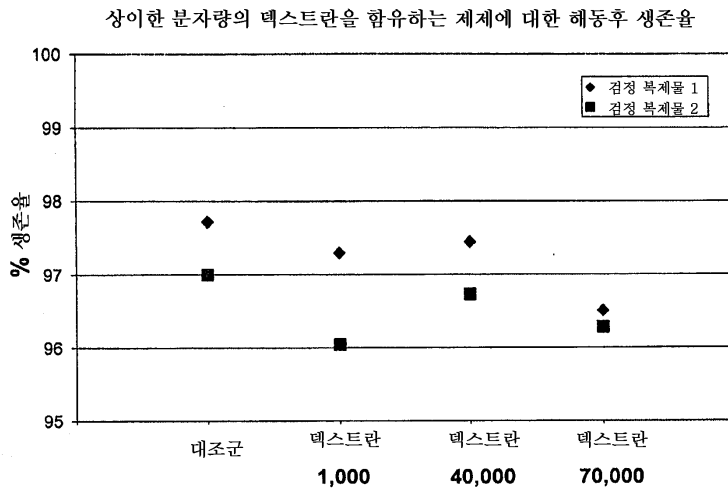
도면12



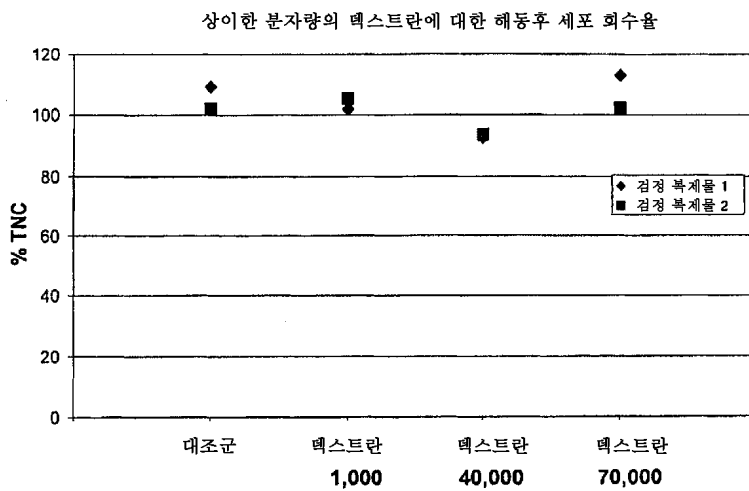
도면13



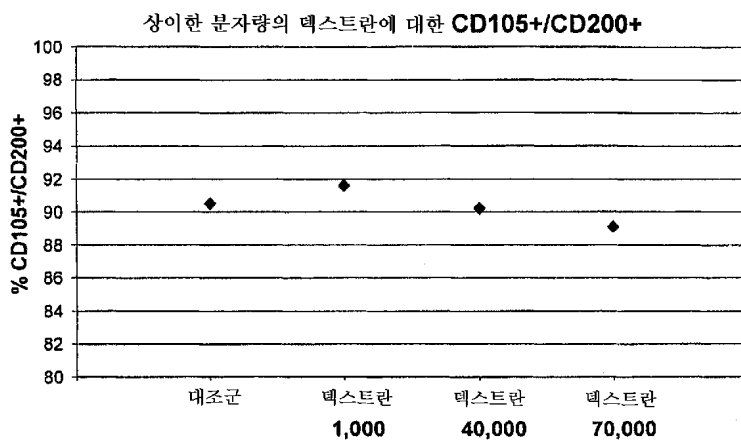
도면14



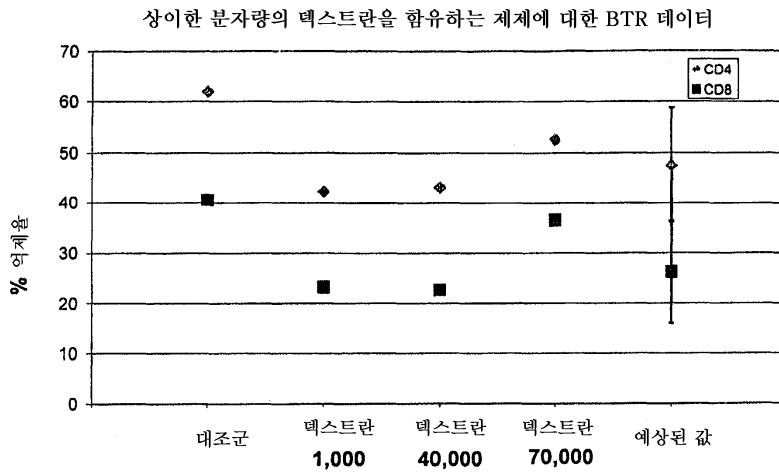
도면15



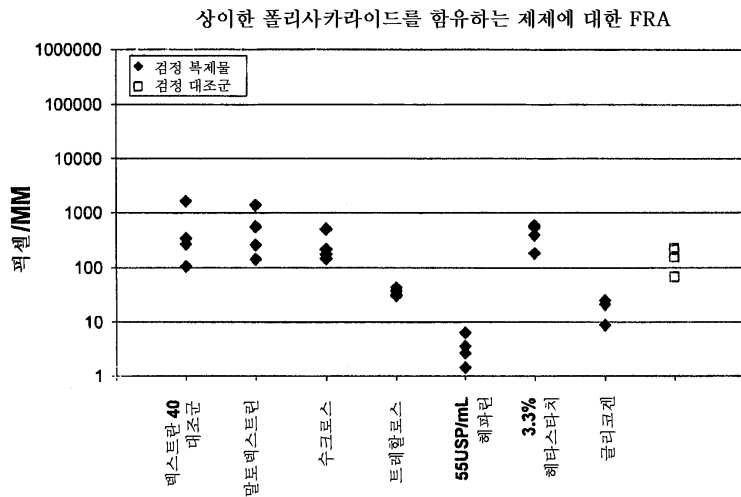
도면16



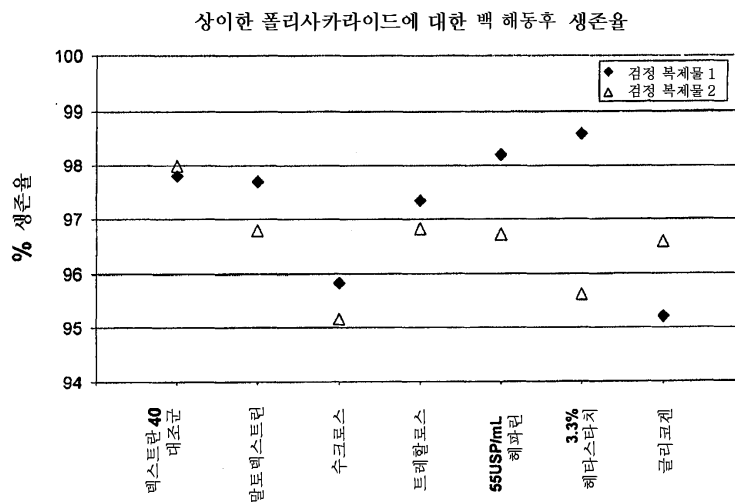
도면17



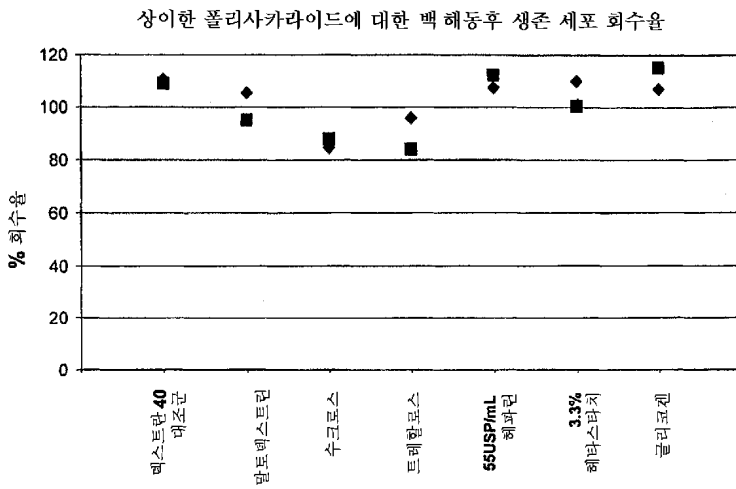
도면18



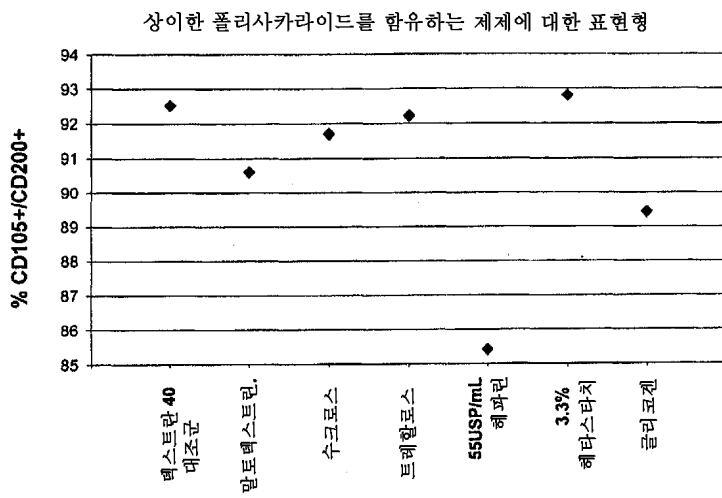
도면19



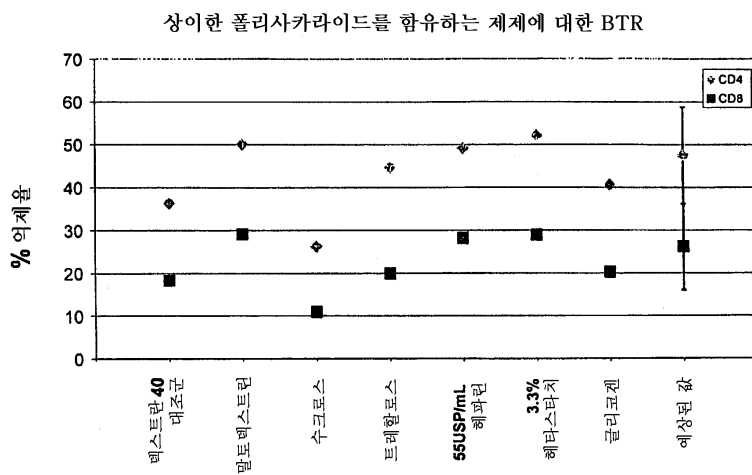
도면20



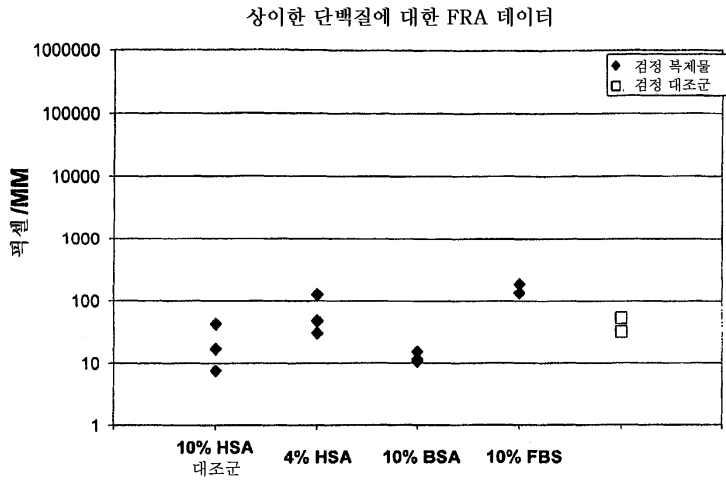
도면21



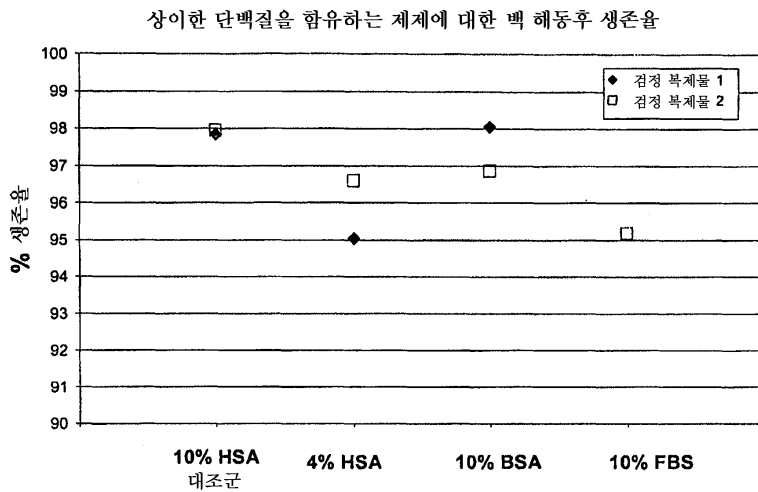
도면22



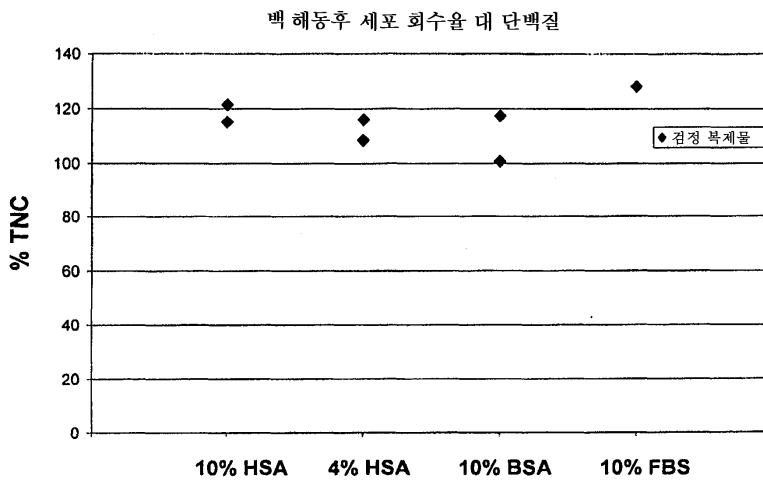
도면23



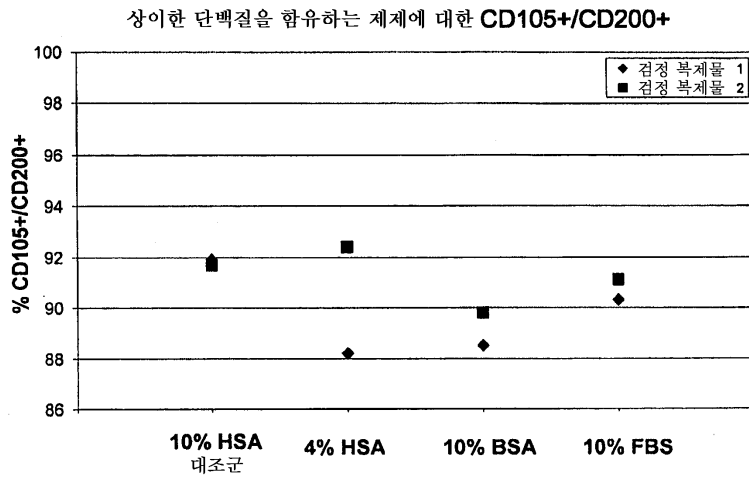
도면24



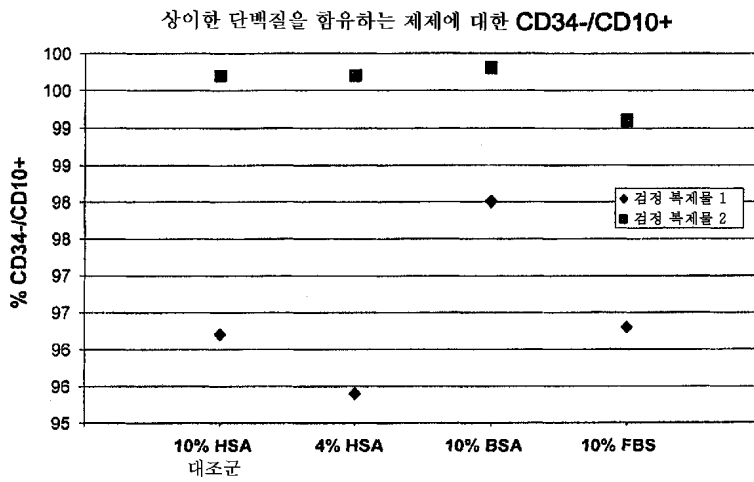
도면25



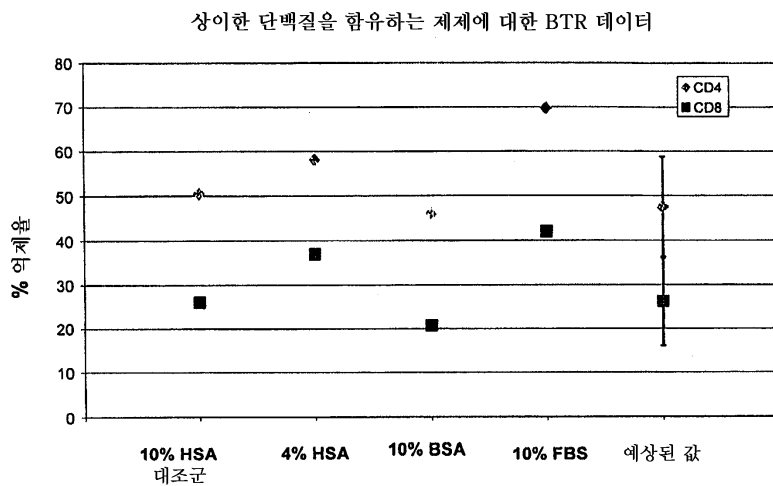
도면26



도면27



도면28



도면29

