



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0072278  
(43) 공개일자 2024년05월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01N 1/02 (2006.01) A61K 35/28 (2015.01)  
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A01N 1/0268 (2013.01)  
A61K 35/28 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7015452
- (22) 출원일자(국제) 2022년10월14일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년05월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2022/000617
- (87) 국제공개번호 WO 2023/062429  
국제공개일자 2023년04월20일
- (30) 우선권주장  
63/255,620 2021년10월14일 미국(US)

- (71) 출원인  
르헤아첼 게엠베하 운트 콤파니 카게  
독일 69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트 517
- (72) 발명자  
에스테를레히너, 야스미나  
독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트 517  
클링겔레, 자브리나  
독일 데-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트 517  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이상남

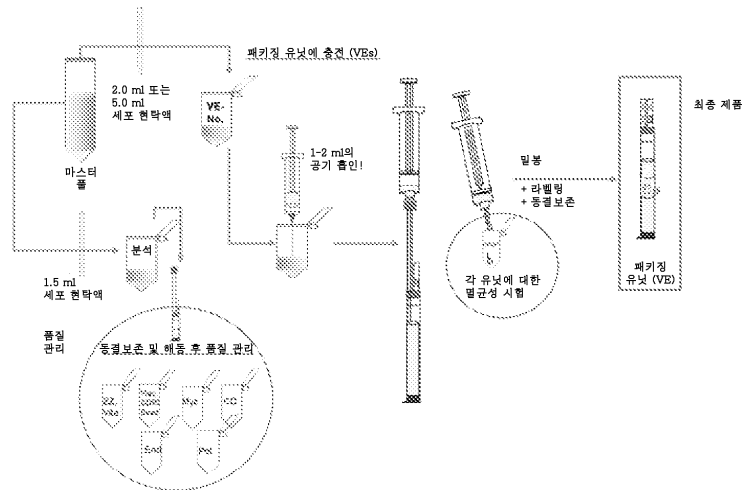
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 ABCB5 줄기 세포 처리

(57) 요약

사용 단위의 극저온 바이알 중에 존재하는, 치료 ABCB5+ 줄기 세포의 집단이 제공된다. 또한, 치료 세포의 제조 방법 및 사용 방법이 제공된다. 폐쇄 시스템 극저온 바이알은 세포 용기에 연결된 충전 튜브 및 공기 배출구를 포함할 수 있다.

대표도 - 도2b



(52) CPC특허분류

*C12N 5/0668* (2013.01)

*C12N 9/00* (2013.01)

(72) 발명자

**발리카이아, 제다**

독일 테-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트  
517

**클루트, 마르크, 안드레아스**

독일 테-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트  
517

**코은레, 막시밀리안**

독일 테-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트  
517

**간스, 크리스토프**

독일 테-69120 하이델베르크 임 노이엔하이머 펠트  
517 르헤아첼 게엠베하 운트 콤파니 카게 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

m1당  $10.4 \times 10^6$ 개  $\pm 20\%$  내지  $15.6 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함하는 사용 단위 바이알 (1)을 포함하며, 여기서 사용 단위 바이알 (1)은 폐쇄 시스템 극저온 바이알인 장치.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 바이알 (1)이 세포 용기 (6)에 연결된 적어도 하나의 충전 튜브 (3)를 포함하는 것인 장치.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 바이알 (1)이 1-2 ml, 1.45-1.50 ml, 4-5 ml, 1-5 ml, 또는 4.05-4.96 ml의 부피를 포함하는 것인 장치.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 바이알 (1)이 m1당  $13 \times 10^6$ 개  $\pm 10\%$ 의 ABCB5+ 줄기 세포 또는 m1당  $10.5 \times 10^6$ 개  $\pm 10\%$  세포를 포함하는 것인 장치.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 용기 (6)가 상단 및 하단을 갖고, 여기서 상단은 공기 배출구 (4) 및 충전 튜브 (3)에 연결되고, 여기서 공기 배출구 (4) 및 충전 튜브 (3)는 각각 원위 표면 및 근위 표면을 갖고, 여기서 각각의 근위 표면은 세포 용기 (6)의 상단에 인접한 것인 장치.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 충전 튜브 (3)가 충전 포트 (2)를 세포 용기 (6)의 상단에 연결하는 것인 장치.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 충전 포트 (2)가 세포 전달 장치 (16)를 부착시키기 위한 밀폐식으로 밀봉된 충전 부착 피스를 포함하는 것인 장치.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 충전 부착 피스가 루어 락인 장치.

#### 청구항 9

제5항에 있어서, 미생물 필터 (5)가 공기 배출구 (4) 내에 위치하는 장치.

#### 청구항 10

ABCB5-양성 세포를 포함하는 풀링된 집단을 제조하고, 세포를 농축시키고, 농축된 세포를 재현탁시켜  $13 \times 10^6$ 개  $\pm 20\%$  세포/ml- $24 \times 10^6$ 개/ml의 세포 농도를 갖는 풀링된 샘플을 생산하고, 임의로 풀링된 샘플로부터 세포의 단위 샘플을 분취하고, 단위 샘플을 폐쇄 시스템 극저온 바이알 (1)의 충전 포트 (2)를 통해 충전 튜브 (3)로 옮기고, 단위 샘플을 세포 용기 (6) 내로 옮겨 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량을 생산하는 것을 포함하는, 치료 세포 용액의 단위 용량을 제조하는 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 단위 샘플이 세포 용기 (6)로 옮겨진 후에 바이알 (1)을 각을 이루게 하여 멸균성 시험 샘플

이 충전 튜브 (3) 내로 다시 통과하도록 하고, 바이알 (1)을 직립 위치로 각을 이루게 하고, 충전 튜브 (3)로부터 멸균성 시험 샘플을 추출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 풀링된 샘플이 ml당 약  $13 \times 10^6$  개 +/- 10% 세포의 세포 농도를 갖는 것인 방법.

**청구항 13**

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단위 샘플이 약 2 ml 또는 약 5 ml인 방법.

**청구항 14**

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 바이알 (1)이 약 90도 각도로 각을 이루는 것인 방법.

**청구항 15**

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단위 샘플이 충전 포트 (2)에 부착된 루어 락 시린지 (16)를 사용하여 충전 튜브 (3)로 옮겨지는 것인 방법.

**청구항 16**

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 충전 포트 (2)가 세포 전달 장치 (16)를 부착시키기 위한 밀폐식으로 밀봉된 충전 부착 피스를 포함하는 것인 방법.

**청구항 17**

제11항에 있어서, 멸균성 시험 샘플이 시린지를 사용하여 충전 튜브 (3)로부터 추출되는 것인 방법.

**청구항 18**

제10항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량이 약 적어도 1.5 ml 또는 4.50 ml의 부피를 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

제10항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량이 ml당 약  $13 \times 10^6 \pm 20\%$ 의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 20**

제10항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 바이알을 해동시키고, 바이알로부터 세포를 추출하고, 시린지에서 세포를 재구성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 21**

제10항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 바이알을 해동시키고, 바이알로부터 세포를 추출하고, 주입 백에서 세포를 재구성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 22**

치료 세포 용액의 단위 용량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 치료 세포 용액의 단위 용량은 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 장치로부터 획득되거나 또는 제10항 내지 제21항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 것인, 대상체를 치료하는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 세포 용액이 대상체의 상처에 투여되는 것인 방법.

**청구항 24**

제22항 또는 제23항에 있어서, 치료 세포 용액의 다중 단위 용량이 대상체에게 투여되는 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 10월 14일에 출원된 미국 가출원 번호 63/255620을 우선권 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 기술분야
- [0004] 잘 정의되어 있지 않은 자기-재생 성체 만능 중간엽 줄기 세포 (MSC)는 진피를 포함한 거의 모든 성체 결합 조직 내에 존재한다. 전형적으로, 이들은 조직 항상성, 복구 및 기관 유지에 필수적인 장기간 자기-재생 능력을 보호하기 위한 결정적인 요건인 적소 환경을 유지한다.

**배경 기술**

- [0005] P-당단백질 ABCB5로도 알려진 ATP-결합 카세트 서브패밀리 B 구성원 5, 약어로는 ABCB5는 형질 막-관통 단백질이다. ABCB1 (MDR1), ABCB4 (MDR2/3) 및 ABCG2 (Bcrp1, MXR1)와 같은 수송체를 비롯한 활성 수송체의 ABC 서브패밀리는 암 환자에서 약물 내성을 유발하는 원인인 것으로 제안되었으며, 비악성 세포 유형에서는 정상적인 세포 수송, 분화 및 생존 기능을 수행한다. 이들 널리 공지된 ABC 수송체는 줄기 및 전구 세포 집단 상에서 높은 수준으로 발현되는 것으로 밝혀졌다. 다수의 조직으로부터의 이러한 세포 하위세트의 단리에 이들 및 관련 ABC 수송체에 의해 매개되는 형광 염료 로다민123(Rhodamine123) 및 핵스트 33342(Hoechst 33342)에 대한 유출 능력이 이용되었다. ABCB5는, 예를 들어 신규 진피 및 안구 세포의 하위집단을 확인시켜 준다.

**발명의 내용**

- [0006] ABCB5<sup>+</sup> 줄기 세포 집단의 조성물은 신뢰할 수 있게 단리되고, 정확한 치료량으로 사용 단위 용기 내로 패키징되는 것으로 본원에 개시된다.
- [0007] 본 개시내용의 일부 양상에서 ml당 10.4 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 15.6 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%의 ABCB5+ 줄기 세포를, 임의로 1-2 ml, 1.45-1.50 ml, 4-5 ml, 1-5 ml, 또는 4.05-4.96 ml의 부피로 포함하는 사용 단위 바이알 (1)을 포함하는 장치가 제공되며, 여기서 사용 단위 바이알 (1)은 폐쇄 시스템 극저온 바이알이다.
- [0008] 일부 양상에서, 해동 후에, 임의로 1.5-5 ml, 1.5-4 ml, 2-5ml, 또는 2-4 ml의 부피로, ml당 8 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 13 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%, 8.5 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 12.5 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%, 8.9 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 12.1 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 또는 8.9 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 12.4 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함하는 사용 단위 바이알 (1)을 포함하는 장치가 제공되며, 여기서 사용 단위 바이알 (1)은 폐쇄 시스템 극저온 바이알이다.
- [0009] 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 세포 용기 (6)에 연결된 적어도 하나의 충전 튜브 (3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 4.50 ml의 부피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 4.0 ml의 부피를 포함한다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 ml당 13 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 바이알이 해동된 후에, ml당 10 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 11 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서 바이알 (1)은 바이알이 해동된 후에, ml당 8 x 10<sup>6</sup>개 내지 13 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%, 8.5 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 12.5 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%, 8.9 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 12.1 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 또는 8.9 x 10<sup>6</sup>개 ± 20% 내지 12.4 x 10<sup>6</sup>개 ± 20%의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 상단 및 하단을 갖는 세포 용기 (6)를 포함하며, 여기서 상단은 공기 배출구 (4) 및 충전 튜브 (3)에 연결된다. 공기 배출구 (4) 및 충전 튜브 (3)는 각각 원위 표면 및 근위 표면을 가지며, 여기서 각각의 근위 표면은 세포 용기 (6)의 상단에 인접한다. 일부 실시양태에서, 충전 튜브 (3)는 충전

포트 (2)를 세포 용기 (6)의 상단에 연결한다. 일부 실시양태에서, 충전 포트 (2)는 세포 전달 장치 (16)를 부착시키기 위한 밀폐식으로 밀봉된 충전 부착 피스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 충전 부착 피스는 루어 락 (Luer lock)이다. 일부 실시양태에서, 미생물 필터 (5)는 공기 배출구 (4) 내에 위치된다.

[0013] 다른 양상에서, 치료 세포 용액의 단위 용량을 제조하는 방법이 제공된다. 방법은 ABCB5-양성 세포를 포함하는 풀링된 집단을 제조하고, 세포를 농축시키고, 농축된 세포를 재현탁시켜  $16 \times 10^6/\text{ml}$ - $24 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $13 \times 10^6/\text{ml}$ - $24 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $13 \times 10^6/\text{ml} \pm 20\%$ ,  $13 \times 10^6/\text{ml} \pm 10\%$ ,  $13 \times 10^6/\text{ml} \pm 5\%$ ,  $13 \times 10^6/\text{ml} \pm 1\%$ , 또는  $13 \times 10^6/\text{ml}$ 의 세포 농도를 갖는 풀링된 샘플을 생산하고, 풀링된 샘플로부터 세포의 단위 샘플을 분취하고, 단위 샘플을 폐쇄 시스템 극저온 바이알 (1)의 충전 포트 (2)를 통해 충전 튜브 (3)로 옮기고, 단위 샘플을 세포 용기 (6)로 옮겨 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량을 생산하는 것을 수반한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 방법은 단위 샘플을 세포 용기 (6)로 옮겨 단위 샘플을 충전 튜브 (3)에 노출시킨 후에 바이알 (1)을 각을 이루게 하고, 멸균성 시험 샘플이 충전 튜브 (3) 내로 통과하도록 하고, 바이알 (1)을 직립 위치로 각을 이루게 하고, 충전 튜브 (3)로부터 멸균성 시험 샘플을 제거하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 풀링된 샘플은 약  $20 \times 10^6$ 개/ml 또는 약  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 10\%$ 의 세포 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 바이알 (1)은 약 90도 각도로 각을 이루고 있다.

[0015] 일부 실시양태에서, 단위 샘플은 약 5 ml이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 단위 샘플은 충전 포트 (2)에 부착된 루어 락 시린지 (16)를 사용하여 충전 튜브 (3)로 옮긴다.

[0017] 일부 실시양태에서, 충전 포트 (2)는 세포 전달 장치 (16)를 부착시키기 위한 밀폐식으로 밀봉된 충전 부착 피스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 멸균성 시험 샘플은 시린지를 사용하여 충전 튜브(3)로부터 추출된다.

[0018] 일부 실시양태에서, 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량은 약 1.5 ml 또는 4.0-4.50 ml의 부피를 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량은 ml당 약  $13 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포가 해동된 후 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량은 ml당 약  $10 \times 10^6 - 10.5 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다. 세포가 해동된 후 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량은 바이알이 해동된 후 ml당 약  $8 \times 10^6$  내지  $13 \times 10^6$ 개,  $8.5 \times 10^6$  내지  $12.5 \times 10^6$ 개,  $8.9 \times 10^6$  내지  $12.1 \times 10^6$ 개 또는  $8.9 \times 10^6$  내지  $12.4 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서 ABCB5+ 줄기 세포 집단은 합성 ABCB5+ 줄기 세포의 집단이며, 여기서 집단의 96% 초과는 생리학적으로 발생하는 ABCB5-양성 줄기 세포의 시험관내 자손이다. 일부 실시양태에서 집단의 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.5%, 99.7%, 99.9%, 99.99%, 99.998%, 99.999%, 또는 99.99997% 초과는 생리학적으로 발생하는 ABCB5-양성 줄기 세포의 시험관내 자손이다. 일부 실시양태에서, 집단의 100%는 생리학적으로 발생하는 ABCB5-양성 진피 줄기 세포 또는 안구 줄기 세포의 시험관내 자손이다.

[0021] 줄기 세포 요법이 유용한 임의의 장애를 치료하기 위한 본 발명의 줄기 세포 집단의 용도, 조직 공학, 또는 저장된 세포를 사용한 상처 치유가 또한 본 발명의 한 양상으로서 제공된다.

[0022] 본 발명의 각각의 제한은 본 발명의 다양한 실시양태를 포함할 수 있다. 따라서, 임의의 한 요소 또는 요소들의 조합을 포함하는 본 발명의 각각의 제한사항들 각각이 본 발명의 양상에 포함될 수 있는 것으로 예측된다. 본 발명은 그의 적용에 있어서 하기 설명에 기재되거나 도면에 도시되는 세부사항 및 구성요소의 배열로 제한되지 않는다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본원에 사용된 어구 및 용어는 설명을 위한 것이며, 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본원에서 "비롯한", "포함하는" 또는 "가진", "함유하는", "포함하는" 및 그의 변형의 사용은 그 뒤에 열거된 항목 및 그의 등가물뿐만 아니라 추가의 항목을 포괄하는 것으로 의도된다.

### 도면의 간단한 설명

[0023] 첨부된 도면은 일정한 비율로 도시된 것으로 의도되지 않는다. 도면에서, 다양한 도면에 도시된 각각의 동일한 또는 거의 동일한 구성요소는 유사한 숫자로 표시된다. 명확성을 위해, 모든 구성요소가 모든 도면에서 표시되

지는 않을 수 있다. 도면에서:

도 1a-1b는 단리된 ABCB5+ 줄기 세포 샘플을, 농축되고 최적 세포 농도로 조정된 풀링된 샘플로 풀링하는 상이한 실시양태를 입증하는 개략적 도시이다.

도 2a-2b는 ABCB5+ 줄기 세포의 풀링된 샘플을 폐쇄 시스템 극저온 바이알 (1)로 옮기고, 시험을 위한 분취물을 단리하고, 저장을 위한 바이알을 제조하는 방법의 상이한 실시양태의 개략적 도시이다.

도 3은 폐쇄 시스템 극저온 바이알 (1)에 세포를 로딩하는 방법을 도시하는 일련의 다이어그램이다. 시린지 (16)는 바이알 (1)의 충전 포트 (2)의 상부에서 부착 피스에 부착되고, 세포는 충전 포트 (2)를 통해 시린지로부터 충전 튜브 (3) 내로 주사되고, 필터 (5)를 통해 세포 용기 (6) 내로 통과하게 된다.

도 4는 폐쇄 시스템 극저온 바이알 (1)의 측면도의 다이어그램이다.

도 5a-5c는 해동된 세포의 재구성 및 전달의 예시적인 실시양태를 입증하는 다이어그램이다. 도 5a는 재구성 용액이 전달 시린지에 흡수되는 것을 도시한다. 도 5b는 이어서 시린지가 바이알로부터 세포를 추출하기 위해 사용될 수 있음을 도시한다. 도 5c는 재구성 용액 내의 세포가 시린지로부터 환자에게 전달될 수 있거나 또는 투여 전에 용량을 감소시키기 위해 일부가 폐기될 수 있음을 도시한다.

도 6은 세포의 재구성 및 전달에 대한 대안적 실시양태를 도시하는 다이어그램이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 일부 양상에서, 본 발명은 ABCB5-양성 줄기 세포를 함유하는 사용 단위 패키징된 제품이다. 세포는 치료 용도에 효과적인 양으로 멸균 바이알에 포장된다. 본 발명 이전에, 단일 사용 용기에서의 저장을 위해 ABCB5+ 줄기 세포를 패키징하는 방법은 공지되지 않았다. 4.05-4.96 ml의 부피에서 임계량의 세포, ml당  $10.4 \times 10^6$  개 내지  $15.6 \times 10^6$  개의 ABCB5+ 줄기 세포의 패키징을 달성하는 방법이 제공된다. 세포는 다양한 치료 목적으로 사용될 수 있다.
- [0025] 따라서, 패키징된 ABCB5<sup>+</sup> 줄기 세포 집단으로 구성된 조성물이 본원에 개시된다. 이들 세포는 단리되고, 정확한 치료량으로 사용 단위 용기로 패키징된다.
- [0026] 세포는 도 4에 도시된 것과 같은 사용 단위 바이알 (1)을 포함하는 장치에 패키징된다. 사용 단위 바이알은 추출되어 환자에게 직접 투여될 수 있는 세포의 단일 치료 적용을 수용하는 바이알이다. 바이알은 전형적으로 조성물 또는 유체 내용물을 내부에 함유하기 위한 마개를 갖는, 조성물, 예컨대 치료제 또는 세포를 수용하기 위한 유리 또는 플라스틱 용기이다.
- [0027] 바이알은 다양한 충전 용량을 가질 수 있고, 멸균 또는 비-멸균일 수 있다. 바람직하게는, 바이알은 멸균 또는 멸균가능하다. 바이알은 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 7ml, 8ml, 9ml, 10ml 및 그 초과를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 액체 부피를 수용하기 위한 다양한 크기로 이용가능하다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 바이알은 적어도 5ml의 부피를 보유한다. 다른 실시양태에서, 바이알은 1-5 ml, 1.5-5 ml, 5-10 ml 또는 5-6 ml의 부피를 보유한다.
- [0028] 일부 실시양태에서 바이알은 폐쇄 시스템 극저온 바이알이다. 극저온 바이알은 초저온을 견디도록 설계된 바이알이다. 일부 실시양태에서, 극저온 바이알은, 예를 들어 저결합 극저온 등급 플라스틱, 예컨대 폴리프로필렌 으로부터 제조되어, 바이알이 상당한 온도 변화를 견디도록 한다. 일부 실시양태에서, 바이알은 상업적으로 입수가능한 시클릭 올레핀 공중합체 (토파스® COC(TOPAS® COC); 토파스 어드밴스드 폴리머스, 게엠베하(TOPAS Advanced Polymers, GmbH))로부터 구축된다. COC 수지는 수성 세포 현탁액이 바이알 표면에 부착하는 것을 방지하는 낮은 수분 흡수를 갖고, -196°C에서만큼 낮은 온도를 견디는 열 특징을 갖는다. 다른 물질이 또한 이용될 수 있다.
- [0029] 동결보존으로도 지칭되는 극저온 공정은 장기간 동안 극저온 배지, 예컨대 액체 질소에서 초저온에서 생존가능한 생물학적 시스템을 저장하는데 유용하다. 이들 저온에서, 세포 대사 활성은 정지된다. 이들 조건 하에 저장된 세포는 저장 전과 유사한 상태로 회수 및 회복될 수 있다. 세포가 사용 준비가 되면, 바이알을 해동시키고, 시린지와 같은 장치를 사용하여 세포를 추출할 수 있다. 바이알로부터 추출된 해동된 세포는 단위 용량이고, 예컨대 환자에게 전달함으로써 치료 과정에 이용될 준비가 된다.

[0030] 바이알의 세포 용기 내의 양은 치료 세포 용액의 단위 용량이다. 치료 세포 용액의 단위 용량은 대상체에게 전달되어 치료 결과를 생성하는 데 유용한 양이다. 단위 용량은 세포의 농도 및/또는 부피에 의해 정의된다. 일부 실시양태에서 치료 세포 용액의 단위 용량은 ml당  $10.4 \times 10^6$ 개 내지  $15.6 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 세포 용액의 단위 용량은  $10.4 \times 10^6$ ,  $10.5 \times 10^6$ ,  $10.6 \times 10^6$ ,  $10.7 \times 10^6$ ,  $10.8 \times 10^6$ ,  $10.9 \times 10^6$ ,  $11.0 \times 10^6$ ,  $11.1 \times 10^6$ ,  $11.2 \times 10^6$ ,  $11.3 \times 10^6$ ,  $11.4 \times 10^6$ ,  $11.5 \times 10^6$ ,  $11.6 \times 10^6$ ,  $11.7 \times 10^6$ ,  $11.8 \times 10^6$ ,  $11.9 \times 10^6$ ,  $12.0 \times 10^6$ ,  $12.1 \times 10^6$ ,  $12.2 \times 10^6$ ,  $12.3 \times 10^6$ ,  $12.4 \times 10^6$ ,  $12.5 \times 10^6$ ,  $12.6 \times 10^6$ ,  $12.7 \times 10^6$ ,  $12.8 \times 10^6$ ,  $12.9 \times 10^6$ ,  $13.0 \times 10^6$ ,  $13.1 \times 10^6$ ,  $13.2 \times 10^6$ ,  $13.3 \times 10^6$ ,  $13.4 \times 10^6$ ,  $13.5 \times 10^6$ ,  $13.6 \times 10^6$ ,  $13.7 \times 10^6$ ,  $13.8 \times 10^6$ ,  $13.9 \times 10^6$ ,  $14.0 \times 10^6$ ,  $14.1 \times 10^6$ ,  $14.2 \times 10^6$ ,  $14.3 \times 10^6$ ,  $14.4 \times 10^6$ ,  $14.5 \times 10^6$ ,  $14.6 \times 10^6$ ,  $14.7 \times 10^6$ ,  $14.8 \times 10^6$ ,  $14.9 \times 10^6$ ,  $15.0 \times 10^6$ ,  $15.1 \times 10^6$ ,  $15.2 \times 10^6$ ,  $15.3 \times 10^6$ ,  $15.4 \times 10^6$ ,  $15.5 \times 10^6$ ,  $15.6 \times 10^6$ ,  $12.5 \times 10^6$ - $13.5 \times 10^6$ ,  $12.6 \times 10^6$ - $13.4 \times 10^6$ ,  $12.7 \times 10^6$ - $13.3 \times 10^6$ ,  $12.8 \times 10^6$ - $13.2 \times 10^6$ , 또는  $12.9 \times 10^6$ - $13.1 \times 10^6$ 개이다. 일부 실시양태에서 바이알은 ml당  $13 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 세포가 해동된 후 바이알 (1) 내의 치료 세포 용액 (7)의 단위 용량은 ml당 약  $10 \times 10^6$ - $10.5 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다. 일부 양상에서, 세포가 해동된 후 단위 용량은 ml당  $8 \times 10^6$ 개 내지  $13 \times 10^6$ 개,  $8.5 \times 10^6$ 개 내지  $12.5 \times 10^6$ 개,  $8.9 \times 10^6$ 개 내지  $12.1 \times 10^6$ 개 또는  $8.9 \times 10^6$ 개 내지  $12.4 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 치료 세포 용액의 단위 용량은 1-5 ml, 1-2 ml, 4-5 ml 또는 4.05-4.96 ml의 부피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 세포 용액의 단위 용량은 1.50, 1.60, 1.70, 1.80, 1.90, 4.05, 4.06, 4.07, 4.08, 4.09, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56, 4.57, 4.58, 4.59, 4.60, 4.61, 4.62, 4.63, 4.64, 4.65, 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.72, 4.73, 4.74, 4.75, 4.76, 4.77, 4.78, 4.79, 4.80, 4.81, 4.82, 4.83, 4.84, 4.85, 4.86, 4.87, 4.88, 4.89, 4.90, 4.91, 4.92, 4.93, 4.94, 4.95, 4.96, 4.1-4.8, 4.2-4.7, 4.3-4.6 또는 4.4-4.5 ml의 부피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이알은 4.50 ml의 부피를 포함한다.

[0033] 바이알은 임의의 통상적인 디자인 또는 형상일 수 있다. 많은 극저온 바이알이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 예시적인 실시양태에서, 극저온 바이알이 도 4에 도시된다. 예시적인 극저온 바이알은 폐쇄 시스템 극저온 바이알이다. 폐쇄 시스템 바이알은 특히 함유된 세포의 멸균성 및 순도를 유지하기 위해 완전히 밀봉된, 예를 들어 밀폐식으로 밀봉된 바이알이다.

[0034] 도 4에 도시된 바이알 (1)은 2개의 주요 구획, 충전 튜브 (3) 및 세포 용기 (6)를 포함한다. 충전 튜브 (3) 및 세포 용기 (6)는 상단 및 하단을 갖는다. 충전 튜브 (3)의 상단은 충전 포트 (2)에 부착될 수 있다. 충전 튜브 (3)의 하단은 세포 용기 (6)의 상단에 연결된다. 공기 배출구 (4)가 세포 용기 (6)의 상단에 연결되고, 미생물 필터 (5)가 공기 배출구 (4) 내에 위치된다. 공기 배출구 튜브 (4)는 또한 공기 배출 튜브 (4)의 바닥이 충전 튜브 (3)에 인접한 세포 용기 (6)의 상단에 노출되도록 충전 튜브 (3)에 인접하여 위치된다. 단위 용량의 치료 세포 용액 (7)이 용기에 포함될 수 있다. 세포 회수 포트 (8)는 세포 용기 (6)의 바닥에 위치된다.

[0035] 공기 배출구 및 충전 튜브는 세포 용기보다 더 유연한 물질로 제조될 수 있다. 예를 들어, 충전 튜브 및 배출 튜브는 극저온 백 시스템에서 통상적으로 사용되는 물질로 제조될 수 있다. 이러한 물질은, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트 (EVA)를 포함한다. 도 4에 도시한 예시적인 바이알에서 3개의 포트, 충전 포트, 배출 포트 및 회수 포트가 제공된다. 충전 포트는 세포 용액이 충전 튜브로 전달될 수 있도록 세포 용액에 대한 접근을 제공하도록 설계된다. 이는 바이알을 충전하기 위해 사용되는 바늘 또는 무바늘 격막을 가질 수 있다. 공기 배출 포트는, 특히 세포가 세포 용기에 첨가되어 이를 충전하여 공기를 대체할 때 공기가 빠져나가게 하는 필터 플러그를 가질 수 있다. 플러그는 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE) 물질로부터 제조될 수 있으며, 이는 압력 하에 공기의 이동을 허용하고 또한 미생물 장벽으로서 작용하여 세포가 용기에 첨가되거나 용기로부터 추출되는 동안

오염물의 도입을 방지할 수 있는 물질로서 바람직하다. 충전 및 공기 배출 포트는 세포가 바이알에 있고 멸균 샘플이 추출되면, 예를 들어 고주파 (RF) 또는 열 밀봉을 사용하여 밀봉된다. 회수 포트는 세포 용기의 바닥에 위치하고, 바이알로부터 세포의 멸균 및 효율적인 추출을 허용하도록 설계된다. 전형적으로, 회수 포트는 바늘로 관통될 수 있는 유연성 플라스틱 물질로 제조된 바늘 격막을 갖는다. 이는 멸균성을 증진시키기 위해 사용 전에 커버될 수 있다. 각각의 포트는 밀폐식으로 밀봉될 수 있다.

[0036] 일부 실시양태에서, 충전 포트는 세포 전달 장치를 부착시키기 위한 충전 부착 피스를 포함한다. 세포 전달 장치가, 예를 들어, 도 2 및 3에서 시린지 (16)로서 도시되어 있다. 시린지를 이용하여, 시린지 바늘을 충전 포트를 통해서 그리고 충전 튜브 내로 삽입함으로써, 세포를 충전 튜브로 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 충전 부착 피스는 루어 락이고, 시린지는 루어 락 팁을 갖는다. 루어 락은 시린지의 루어 락 팁과 함께 끼워질 수 있는 돌출된 가이드를 가지며, 이에 따라 시린지 팁을 그 위에서 돌려서 조이면 부착 피스와 시린지 사이에 밀착 맞춤 결합이 달성된다. 밀착 맞춤은 누출 및 오염에 대한 임의의 노출을 방지한다.

[0037] 본 발명의 치료 세포 용액의 단위 용량을 제조하기 위한 예시적인 방법이 도 1-3 및 5-6에 제시된다. 방법은 처음에 ABCB5-양성 세포를 포함하는 풀링된 집단을 제조하는 것을 수반한다. 세포는 1차 공급원으로부터 직접 제조되고/거나, 합성 초순수 세포 집단으로서 개발되고/거나, 세포 집단을 조각함으로써 생산될 수 있다.

[0038] ABCB5+ 줄기 세포를 단리하고, 튜브 (10)로 옮긴다. 세포를 농축시키고, 튜브 내에 재현탁시킬 수 있다. 재현탁된 물질을 풀링된 튜브 (12)에 첨가하여 풀링된 샘플을 생산한다. 예를 들어, ABCB5-양성 세포를 함유하는 5개의 단일 단리물을 용기, 예컨대 50 ml 튜브 (12)에서 풀링할 수 있다. 각각의 50 ml 튜브를, 예를 들어 10 ml 단리 용액으로 연속적으로 행구어 모든 나머지 ABCB5+ 세포를 튜브로부터 꺼낸다. 이어서, 풀링된 세포 샘플을 예를 들어 원심분리에 의해 농축시킨다. 농축된 펠릿을 주어진 부피로 재현탁시킨다. 일부 실시양태, 예컨대 도 1a에 도시된 방법에서, 세포 펠릿이 재현탁되면 세포의 농도를 계산한다. 도 1b에 도시된 것과 같은 대안적 실시양태에서, 세포의 농도는 세포가 펠릿화되기 전에, 즉 원래 세포 농도에 기초하여 계산된다. 계산 후에, 세포의 농도는  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 20\%$  또는  $16 \times 10^6$ 개/ml- $24 \times 10^6$ 개/ml, 또는  $20 \times 10^6$ 개/ml의 세포 농도를 갖는 마스터 풀링된 샘플 (14)을 생산하도록 조정될 수 있으며, 이는 단위 치료 용량을 생산하는데 중요할 것이다. 일부 실시양태에서, 치료 세포의 단위 용량은  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 20\%$ 이다.

[0039] 일부 실시양태에서, 마스터 풀링된 샘플 중 세포의 농도는 약  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 20\%$ ,  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 15\%$ ,  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 10\%$ ,  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 5\%$ ,  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 3\%$ ,  $13 \times 10^6$ 개/ml  $\pm 1\%$ ,  $13 \times 10^6$ 개/ml,  $16 \times 10^6$ ,  $16.1 \times 10^6$ ,  $16.2 \times 10^6$ ,  $16.3 \times 10^6$ ,  $16.4 \times 10^6$ ,  $16.5 \times 10^6$ ,  $16.6 \times 10^6$ ,  $16.7 \times 10^6$ ,  $16.8 \times 10^6$ ,  $16.9 \times 10^6$ ,  $17.0 \times 10^6$ ,  $17.1 \times 10^6$ ,  $17.2 \times 10^6$ ,  $17.3 \times 10^6$ ,  $17.4 \times 10^6$ ,  $17.5 \times 10^6$ ,  $17.6 \times 10^6$ ,  $17.7 \times 10^6$ ,  $17.8 \times 10^6$ ,  $17.9 \times 10^6$ ,  $18.0 \times 10^6$ ,  $18.1 \times 10^6$ ,  $18.2 \times 10^6$ ,  $18.3 \times 10^6$ ,  $18.4 \times 10^6$ ,  $18.5 \times 10^6$ ,  $18.6 \times 10^6$ ,  $18.7 \times 10^6$ ,  $18.8 \times 10^6$ ,  $18.9 \times 10^6$ ,  $19.0 \times 10^6$ ,  $19.1 \times 10^6$ ,  $19.2 \times 10^6$ ,  $19.3 \times 10^6$ ,  $19.4 \times 10^6$ ,  $19.5 \times 10^6$ ,  $19.6 \times 10^6$ ,  $19.7 \times 10^6$ ,  $19.8 \times 10^6$ ,  $19.9 \times 10^6$ ,  $20.0 \times 10^6$ ,  $20.1 \times 10^6$ ,  $20.2 \times 10^6$ ,  $20.3 \times 10^6$ ,  $20.4 \times 10^6$ ,  $20.5 \times 10^6$ ,  $20.6 \times 10^6$ ,  $20.7 \times 10^6$ ,  $20.8 \times 10^6$ ,  $20.9 \times 10^6$ ,  $21.0 \times 10^6$ ,  $21.1 \times 10^6$ ,  $21.2 \times 10^6$ ,  $21.3 \times 10^6$ ,  $21.4 \times 10^6$ ,  $21.5 \times 10^6$ ,  $21.6 \times 10^6$ ,  $21.7 \times 10^6$ ,  $21.8 \times 10^6$ ,  $21.9 \times 10^6$ ,  $22.0 \times 10^6$ ,  $22.1 \times 10^6$ ,  $22.2 \times 10^6$ ,  $22.3 \times 10^6$ ,  $22.4 \times 10^6$ ,  $22.5 \times 10^6$ ,  $22.6 \times 10^6$ ,  $22.7 \times 10^6$ ,  $22.8 \times 10^6$ ,  $22.9 \times 10^6$ ,  $23.0 \times 10^6$ ,  $23.1 \times 10^6$ ,  $23.2 \times 10^6$ ,  $23.3 \times 10^6$ ,  $23.4 \times 10^6$ ,  $23.5 \times 10^6$ ,  $23.6 \times 10^6$ ,  $23.7 \times 10^6$ ,  $23.8 \times 10^6$ ,  $23.9 \times 10^6$ ,  $24.0 \times 10^6$ , 또는  $19 \times 10^6$ - $21 \times 10^6$ 개이다. 일부 실시양태에서, 마스터 풀링된 샘플은 ml당 약  $13 \times 10^6$ 개의 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개수는 생존 및/또는 무손상 세포를 지칭한다.

[0040] 개별 세포 단리물 내의 세포의 양의 합계는 원심분리 동안의 세포 손실로 인해 풀링 후의 총 세포 수에 상응하지 않는 것으로 입증되었다. 따라서, 풀링된 세포가 원심분리 후에 재현탁될 재현탁 부피가 결정된다. 재현탁 부피를 계산하기 위해, 약  $20 \times 10^6$ 개/ml의 세포 농도가 사용된다. 세포 농도 단계의 이러한 조정은 세포의 궁극적인 단위 용량을 달성하기 위해 검정에서 다중 인자를 보상하는데 필수적이다. 이 단계에서 보다 높은 농도는 최종 생성물에서 세포 생존율의 감소를 유발하였다. 추가로, 펠릿 부피는 최종 세포 수에서 역할을 하고, 따라서 풀링된 샘플에 대한 표적 농도를 설정하는데 이용되었다. 단위 세포 용량에 대한  $13 \times 10^6$ 개/ml +/- 20%의 표

적 농도가 검증되었다.

- [0041] 세포의 단위 샘플은 추가의 처리를 위해 마스터 풀링된 샘플로부터 분리된다. 추가로 처리되고 동결보존되는 세포의 부피는 크게 다를 수 있다. 예를 들어, 처리되고 동결보존되는 세포의 부피는 0.5 ml - 100 ml 또는 그 사이의 임의의 정수일 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 처리를 위해 튜브로 옮겨진 세포의 부피는 1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml, 3.5 ml, 4 ml, 4.5 ml, 5 ml, 5.5 ml, 6 ml, 6.5 ml, 7 ml, 7.5 ml, 8 ml, 8.5 ml, 9 ml, 9.5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 또는 50 ml이다. 전반에 걸쳐 사용되는 한 실시양태에서, 5 ml의 세포가 마스터 풀로부터 추출되고, 직접 또는 개별 튜브 (18)로 옮겨진 후에 시린지 (16)로 옮겨진다. 5 ml의 예시적인 부피가 전반에 걸쳐 사용되지만, 다른 부피가 고려되고, 통상의 기술자는 사용된 부피에 기초하여 세포 수를 조정할 수 있다.
- [0042] 시험 샘플, 즉 1 ml의 마스터 풀링된 샘플을 분리하여 분석 처리에 사용할 수 있다. 분석 처리를 위한 시험 샘플은 동결보존 전 및/또는 후에 샘플로부터 추출될 수 있다. 나머지 세포 현탁액은 패키징 유닛의 제조에 사용된다. 이 목적을 위해, 5 ml의 세포 현탁액을 5 ml 튜브 (18)로 옮기고, 도 2a-2b에 제시된 바와 같이 시린지 (16) (즉, 5 ml) 및 캐놀라를 사용하여 조심스럽게 천천히 흡인한다. 1 내지 2 ml 공기를 시린지에 첨가하여 과정을 향상시킨다. 바람직한 실시양태에서, 충전, 동결보존, 해동 및 수집 후, 최종 생성물 중 적어도 4.0-4.5 ml ± 10%의 부피가 제공되도록, 패키징 유닛당 5 ml 부피의 세포 현탁액이 검증된다. 일단 시린지(16) 내에 있으면, 세포의 단위 샘플은 바이알(1)로 옮길 수 있다. 구체적으로, 캐놀라를 제거한 후, 시린지는 극저온 바이알의 루어 락에 의해 상부에 연결된다. 세포 현탁액은 폐쇄 시스템 극저온 바이알의 충전 포트 (2)를 통해 충전 튜브 (3)로 천천히 옮긴다. 1 내지 2 ml의 공기를 시린지로 빨아들여 전체 세포 현탁액이 바이알 내에 있도록 하였다.
- [0043] 또 다른 실시양태에서, 도 2b에 도시된 바와 같이, 2 ml의 세포 현탁액을 2 ml 튜브 (18) 내로 옮기고, 시린지 (16) (즉, 2 ml) 및 캐놀라를 사용하여 조심스럽게 천천히 흡인한다. 1 내지 2 ml 공기를 시린지에 첨가하여 과정을 향상시킨다. 바람직한 실시양태에서, 충전, 동결보존, 해동 및 수집 후, 최종 생성물 중 적어도 1.5 ml ± 10%의 부피가 제공되도록, 패키징 유닛당 2 ml 부피의 세포 현탁액이 검증된다.
- [0044] 단위 샘플이 충전 튜브 내로 옮긴 후, 이는 충전 튜브 (3)로부터 세포 용기 (6) 내로 횡단한다. 방법은 단위 샘플이 세포 용기 (6)로 옮겨진 후 바이알 (1)을 각을 이루게 하여 충전 튜브 (3) 내로 멸균성 시험을 위한 단위 샘플의 작은 부분을 추출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 바이알이 절반 정도 뒤집히고 세포 용기 (6)가 옆으로 향하고 세포의 일부가 다시 충전 튜브로 옮겨지도록 약 90° 회전이 사용된다. 작은 샘플, 약 0.95-0.05 ml 후, 바람직하게는 약 0.50 ml를 충전 튜브로 옮기고, 바이알을 다시 90° 회전시켜 바이알을 올바른 방향이 되도록 하였다. 이제 2개의 액체 상이 별도로 존재한다. 이어서, 충전 튜브 내에 있는 멸균 샘플을 시린지 내로 빨아낸다. 루어 연결부를 조심스럽게 분리하고, 시린지를 바이알로부터 제거하였다. 멸균성 샘플은 멸균성 시험에 사용될 수 있다. 이어서, 충전 튜브 및 공기 배기 튜브를 밀봉한다. 이어서, 밀봉된 바이알을 표지하고, 동결보존시킬 수 있다.
- [0046] 동결보존은 생물학적 물질이 매우 낮은 온도, 전형적으로 약 -80°C 내지 -196°C에서 예를 들어 기계적 초저온 동결기 또는 액체 질소 극저온 동결기 또는 탱크에서 저장되도록 하는 방법이다. 동결보존은 생물학적 물질, 예컨대 세포를, 생물학적 물질의 기능적 저하 또는 열화 없이, 비교적 장기간 동안 잠재적으로 무기한으로 저장하는 것으로 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 생산된 세포는 동결보존되고, 액체 질소의 기체-상 (≤ -130°C)에서 저장된다.
- [0047] 동결된 세포가 사용할 준비가 되면, 바이알을 회수하고 해동시킬 수 있다. 세포 용기의 바닥의 세포 회수 포트가 시린지로 접근하여 세포를 추출할 수 있고, 이는 이어서 치료 용도로 준비된다. 패키징 단위는 완성된 약물 제품, 단위 용량의 치료 세포 용액 (7)을 포함한다. 세포의 단일 단위 용량은 환자에게 직접 전달되거나 또는 환자에 대한 맞춤 용량을 생성하도록 재구성될 수 있다. 치료될 적응증의 유형 및/또는 환자의 크기에 따라, 용량은 치료 세포 용액의 단일 또는 다중 단위 용량을 포함할 수 있다. 예를 들어, 치료량은  $5.8 \times 10^7$  내지  $1 \times 10^{10}$  개 세포,  $1 \times 10^7$  내지  $1 \times 10^{10}$  개, 또는  $1 \times 10^7$  내지  $2 \times 10^8$  개 또는 그 초과 범위일 수 있고, 투여는 특정한 적응증 및 개체에 적절한 것으로 결정된 바와 같이 규칙적 간격 (예를 들어, 매주, 매월 등)으로 반복될 수 있다.
- [0048] 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 단위 용량은  $10.5 \times 10^6$  개 세포/ml이다. 일부 실시양태에서, 해동된

바이알 내의 세포의 농도는  $10 \times 10^6 - 11 \times 10^6$  개이다. 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 세포의 농도는  $10.2 \times 10^6 - 10.8 \times 10^6$  개이다. 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 세포의 농도는  $10.4 \times 10^6 - 10.6 \times 10^6$  개이다. 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 단위 용량은  $8 \times 10^6$  내지  $13 \times 10^6$  개이다. 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 단위 용량은  $8.5 \times 10^6$  내지  $12.5 \times 10^6$  개이다. 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 단위 용량은  $8.9 \times 10^6$  내지  $12.1 \times 10^6$  개이다. 일부 실시양태에서, 해동된 바이알 내의 단위 용량은  $8.9 \times 10^6$  내지  $12.4 \times 10^6$  개이다.

[0049] 해동된 세포는 재구성되고 환자에게 전달하기 위해 준비될 수 있다. 일부 실시양태에서, 해동된 세포는 도 5에 도시된 바와 같이 재구성되고 전달된다. 재구성 용액 (20)의 부피는 예를 들어 도 5a에 도시된 바와 같이 전달 시린지 (22) 내에 흡수될 수 있다. 이어서, 시린지는 도 5b에 도시된 바와 같이 바이알 (1)로부터 세포를 추출하기 위해 사용될 수 있다. 재구성 용액 내의 총 세포는 도 5c에 도시된 바와 같이 시린지로부터 환자에게 전달되거나 일부는 투여 전에 용량을 감소시키기 위해 폐기될 수 있다.

[0050] 다른 실시양태에서, 세포는 도 6에 도시된 바와 같이 재구성되고 전달될 수 있다. 주입 백 (24)은 즉각적인 또는 추후의 재구성 및 적용을 위해 재구성 용액으로 충전 또는 사전충전될 수 있다. 세포 바이알의 해동 후, 세포 현탁액을 시린지 내로 뽑아내고, 주입 백 (24) 내로 옮길 수 있다. 세포는 환자에게 투여하기 전에 주입 백 내의 용액과 혼합될 수 있다. 세포는 주입 백으로부터 환자에게 직접 투여될 수 있다.

[0051] 본원에 개시된 장치에 저장된 세포는 ABCB5+ 줄기 세포의 집단이다. 본원에 사용된 용어 "세포의 집단"은 적어도 2종, 예를 들어 2종 이상, 예를 들어 1종 초과 ABCB5+ 줄기 세포를 포함하는 조성물을 지칭하고, 달리 명시되지 않는 한 임의의 수준의 순도 또는 다른 세포 유형의 존재 또는 부재를 나타내지 않는다. 예시적인 실시양태에서, 집단은 다른 세포 유형이 실질적으로 없다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 집단은 명시된 세포 유형의, 또는 명시된 기능 또는 특성을 갖는 적어도 2종의 세포를 포함한다.

[0052] ABCB5+ 줄기 세포는 단리된 세포일 수 있다. 세포는 조직, 예컨대 피부 또는 눈 조직, 예를 들어 인간 조직으로부터 단리될 수 있다. 단리된 조직은 직접 사용될 수 있거나 또는 배양될 수 있다.

[0053] 세포 집단은 일부 실시양태에서 고도로 순수한 합성 세포 집단일 수 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, 세포의 100%가 합성이고, 세포의 0%는 공여자 조직, 예컨대 인간 조직으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 적어도 95%, 95.1%, 95.2%, 95.3%, 95.4%, 95.5%, 95.6%, 95.7%, 95.8%, 95.9%, 96.0%, 96.1%, 96.2%, 96.3%, 96.4%, 96.5%, 96.6%, 96.7%, 96.8%, 96.9%, 97.0%, 97.1%, 97.2%, 97.3%, 97.4%, 97.5%, 97.6%, 97.7%, 97.8%, 97.9%, 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.85%, 99.86%, 99.87%, 99.88%, 99.89%, 99.90%, 99.95%, 99.96%, 99.97%, 99.98%, 99.99%, 또는 99.99% 내지 99.99997%의 시험관내 제조된 또는 합성 ABCB5+ 줄기 세포를 포함한다.

[0054] ABCB5+ 줄기 세포는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 단리되고 공정될 수 있다. 예를 들어, 세포는, 예를 들어 ABCB5-특이적 항체를 사용하여 조직, 예컨대 피부 또는 안구 조직으로부터 단리될 수 있다. ABCB5+ 줄기 세포의 다중 배치를 성장시키고, 계대시킨 다음, 풀링하여 풀링된 샘플을 형성할 수 있다. 풀링된 샘플은 ABCB5-양성 세포의 다중 단일 배치 (즉, 단리, 배양 또는 합성 세포)를 하나로 합한 샘플이다. 전형적으로, 일부 실시양태에서, 하나의 풀링된 샘플 (마스터 배치로도 지칭됨)은 동일한 출발 물질 (즉, 동일한 공여자)로부터 기원하거나 또는 예를 들어 동일한 계대 수로 동일한 날에 병행하여 단리된 다중 단일 배치로 구성된다.

[0055] 샘플 중 세포의 양 및 세포 생존율은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 세포 카운트 및 세포 생존율의 결정을 위한 자동화 방법은 유동 세포측정법을 포함한다. 유동 세포측정법 (즉, BD 아큐리 C6 유동 세포측정기)은 세포 현탁액 중 살아있는 세포를 정량화하는 신속하고 신뢰가능한 방법을 제공한다. 세포 생존율을 평가하는 한 방법은 염료 배제를 사용하는 것이다. 살아있는 세포는 비-생존 세포의 손상된 투과성 막을 용이하게 침투하는 다양한 염료를 배제하는 무손상 막을 갖는다.

[0056] 세포 카운트 뿐만 아니라 생존율의 결정은 합성 줄기 세포의 단리 후에, 그의 동결보존 직전에 수행된다.

[0057] 예시적인 세포 분석은 단일 또는 풀링된 샘플 또는 극저온 바이알로부터의 10  $\mu$ l 세포 현탁액을 1.5 ml 반응 튜브 (80  $\mu$ l 베르센(Versene) 함유) 내로 피펫팅하는 것을 수반한다. 10  $\mu$ l PI 용액 (1 mg/ml)을 첨가한 후, 베르센으로 총 부피를 500  $\mu$ l로 조정하고, BD 아큐리 C6 유동 세포측정기(BD Accuri C6 Flow Cytometer)

를 사용하여 측정을 수행한다. 세포 계수 및 생존율을 계산한다. 세포 생존율에 대한 이상적인 허용 기준은  $\geq 90\%$ 이다.

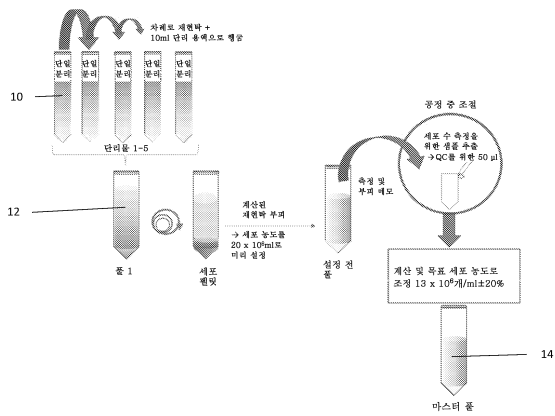
- [0058] 세포 생존율은 또한 칼세인-AM(Calcein-AM)(칼세인 아세톡시메틸에스테르) 염색을 수반한 유동 세포측정법을 사용하여 평가될 수 있다. 칼세인 AM은 온전한 살아있는 세포를 쉽게 투과하는 비-형광 소수성 화합물이다. 세포에 진입 시, 세포내 에스테라제는 아세톡시메틸 (AM) 에스테르 기를 절단하여, 세포질에 잘 보유되는 친수성의 강한 형광 화합물인 칼세인을 생산한다. 세포막이 손상된 아포토시스 및 사멸 세포는 칼세인을 보유하지 않는다. 칼세인은 495 nm에서 최적으로 여기되고, 515 nm의 피크 방출을 갖는다.
- [0059] 세포 생존율 측정은 세포 생존율에 대한 정보를 제공하기 위해 세포의 동결보존 직전에 수행될 수 있다. 세포 생존율은 단지 세포가 살아있는지 또는 죽었는지를 결정하는 PI를 사용한 세포 생존율 결정과 달리 단리된 세포의 실제 대사 활성에 대한 정보를 제공한다.
- [0060] ABCB5+ 줄기 세포는 바람직하게는 단리된다. 본원에 사용된 "단리된 합성 ABCB5+ 줄기 세포"는 그의 자연 환경이 아닌 조건에 놓인 세포의 제제를 지칭한다. 용어 "단리된"은 이후에 이들 세포를 다른 세포와의 조합 또는 혼합물로 또는 생체내 환경에서 사용하는 것을 배제하지 않고, 공여자로부터 단리된 1차 세포, 배양된 세포 및 합성 세포를 포함한다.
- [0061] 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 실질적으로 순수한 제제로서 제조될 수 있다. 용어 "실질적으로 순수한"은 제제에 ABCB5 양성 줄기 세포 이외의 세포가 실질적으로 없다는 것을 의미한다. 예를 들어, ABCB5 세포는 존재하는 총 세포의 적어도 70%를 구성해야 하며, 보다 큰 백분율, 예를 들어 적어도 85, 90, 95 또는 99%가 바람직하다.
- [0062] 본 발명의 치료 ABCB5+ 줄기 세포는 많은 상이한 치료 목적으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 치료 세포는 조직 복구 및 재생, 동계 이식 피부 상처 치유, 동종 이식, 말초 동맥 폐쇄성 질환 - PAOD, 급만성 간부전 - AOCLF, 수포성 표피박리증 - EB 및 많은 다른 질환에 사용될 수 있다. 예를 들어, 윤부 줄기 세포 결핍 (LSCD) 및 다른 각막 및 안구 장애의 치료를 위한 KRT12+ 각막 분화 능력이 있다. 그의 상처 치유 촉진 인자 생산 및 방출 능력으로 인해, ABCB5+ 줄기 세포는 급성 및 만성 상처를 치료하는데 유용하다.
- [0063] 치료 ABCB5+ 줄기 세포는 일부 실시양태에서 면역 매개 질환을 치료하는 데 유용하다. 면역 매개 질환은 유해한 면역 반응과 연관된 질환, 즉 조직을 손상시키는 것이다. 이들 질환은 이식, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 간 질환, 신장 질환 및 신경변성 질환을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0064] 항원(들)에 대한 면역 반응이 감소 또는 제거되도록 면역계에 의한 반응을 호전시키기 위해 치료 ABCB5+ 줄기 세포가 이식에 사용될 수 있다는 것이 발견되었다. 이식은 조직 또는 기관을 한 신체 또는 신체 부분으로부터 또 다른 곳으로 이식하는 행위 또는 과정이다. 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 숙주에 대해 자가이거나 (동일한 숙주로부터 획득됨) 또는 숙주에 대해 동종 또는 동계인 세포와 같은 비-자가일 수 있다. 비-자가 세포는 환자 또는 기관의 공여자 이외의 다른 사람으로부터 유래된다. 대안적으로, 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 숙주에 대해 이종인 공급원으로부터 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 합성된다. 따라서, 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 이식 수용자에게 치료용 ABCB5+ 줄기 세포를 이식에 대한 면역 반응을 억제하거나 호전시키는 데 유효한 양으로 투여함으로써 이식 (조직, 기관, 세포 등)에 대한 면역 반응을 억제하거나 호전시키는 데 사용된다.
- [0065] 본 발명의 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 자가면역 질환을 치료 및 예방하는데 또한 유용하다. 자가면역 질환은 대상체 자신의 항체가 숙주 조직과 반응하거나 또는 면역 이펙터 T 세포가 내인성 자기 펩티드에 대해 자가반응성이고 조직의 파괴를 유발하는 질환의 부류이다. 따라서, 면역 반응은 자기 항원으로 지칭되는 대상체 자신의 항원에 대해 시작된다. 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 크론병, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 자가면역 뇌척수염, 중증 근무력증 (MG), 하시모토 갑상선염, 굿패스처 증후군, 천포창 (예를 들어, 심상성 천포창), 그레이브스병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 항-콜라겐 항체를 갖는 경피증, 혼합 결합 조직 질환, 다발근염, 악성 빈혈, 특발성 애디슨병, 자가면역-연관 불임, 사구체신염 (예를 들어, 초승달 사구체신염, 증식성 사구체신염), 수포성 유천포창, 쇼그렌 증후군, 인슐린 저항성 및 자가면역 당뇨병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 사용된 "자기-항원"은 정상 숙주 조직의 항원을 지칭한다. 정상 숙주 조직은 암 세포를 포함하지 않는다.
- [0066] 자가면역 질환의 예는 항-사구체 기저막 (GBM) 질환이다. GBM 질환은 IV형 콜라겐의 3쇄의 비콜라겐성 도메인 1 (3(IV)NC1)에 대한 자가면역 반응으로부터 유발되고, 고통받는 환자에게서 급속 진행성 사구체신염 (GN) 및 궁극적으로 신부전을 유발한다. 또 다른 자가면역 질환은 크론병이다. 합성 ABCB5+줄기 세포를 사용한 크론병의 치료를 위한 임상 시험이 수행되었다. 크론병은 장 및 위장관의 염증과 연관된 만성 상태이다.

- [0067] 자가면역 질환의 치료에 사용되는 경우에, 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 바람직하게는 정맥내 주사에 의해 투여될 것이고, 유효 용량은 질환 진행을 늦추거나 또는 질환과 연관된 1종 이상의 증상을 완화시키는데 필요한 양일 것이다. 예를 들어, 재발성 다발성 경화증의 경우에, 유효 용량은 적어도 재발의 빈도 또는 중증도를 감소시키는데 필요한 양이어야 한다. 류마티스 관절염의 경우에, 유효량은 적어도 환자가 경험하는 통증 및 염증을 감소시키는데 필요한 세포의 수일 것이다.
- [0068] 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 또한 간 질환의 치료에 유용하다. 간 질환은 간 조직을 손상시키는 질환, 예컨대 간염을 포함한다. 보다 일반적으로, 본 발명의 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 알콜성 간 질환, 간염 (A형, B형, C형, D형 등), 초점성 간 병변, 원발성 간세포성 암종, 간의 큰 낭성 병변, 초점성 결절성 과형성 육아종성 간 질환, 간 육아종, 혈색소증, 예컨대 유전성 혈색소증, 철 과부하 증후군, 급성 지방간, 임신 과다구토, 임신 동안의 병발성 간 질환, 간내 담즙정체, 간부전, 전격성 간부전, 황달 또는 무증상 고빌리루빈혈증, 간세포에 대한 손상, 크리글러-나자르 증후군, 윌슨병, 알파-1-항트립신 결핍, 길버트 증후군, 고빌리루빈혈증, 비알콜성 지방간염, 포르피린증, 비경변성 문맥 고혈압, 비경변성 문맥 고혈압, 문맥 섬유증, 주혈흡충증, 원발성 담즙성 간경변증, 버드-키아리 증후군, 골수 이식 후의 간 정맥-폐쇄성 질환 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 간 질환, 장애 또는 상태의 치료에 사용될 수 있다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 본 발명은 ABCB5+ 줄기 세포를 사용하여 신경변성 질환을 치료하는 것에 관한 것이다. 일부 경우에, 본 발명은 신경변성 질환, 또는 신경변성으로 이어질 수 있는 신경 세포에 대한 손상을 갖는 대상체의 치료를 고려한다. "신경변성 장애" 또는 "신경변성 질환"은 뉴런의 진행성 상실이 말초 신경계 또는 중추 신경계에서 발생하는 장애로서 본원에 정의된다. 신경변성 장애의 비제한적 예는 (i) 만성 신경변성 질환, 예컨대 가족성 및 산발성 근위축성 측삭 경화증 (각각 FALS 및 ALS), 가족성 및 산발성 파킨슨병, 헌팅톤병, 가족성 및 산발성 알츠하이머병, 다발성 경화증, 올리브고뇌소뇌 위축, 다계통 위축, 진행성 핵상 마비, 미만성 루이 소체 질환, 피질치상핵흑질 변성, 진행성 가족성 근간대성 간질, 선조체흑질 변성, 비틀림 이상긴장증, 가족성 진전, 다운 증후군, 질 드 라 투렛 증후군, 할러보르텐스-파츠병, 당뇨병성 말초 신경병증, 권투선수 치매, AIDS 치매, 연령 관련 치매, 연령 연관 기억 장애, 및 아밀로이드증 관련 신경변성 질환, 예컨대 전염성 해면상 뇌병증과 연관된 프리온 단백질 (PrP)에 의해 유발된 것 (크로이츠펠트-야콥병, 게르스트만-스트라우슬러-샤잉커 증후군, 스크래피, 및 쿠루), 및 과량의 시스타틴 C 축적에 의해 유발된 것 (유전성 시스타틴 C 혈관병증); 및 (ii) 급성 신경변성 장애, 예컨대 외상성 뇌 손상 (예를 들어, 수술 관련 뇌 손상), 뇌 부종, 말초 신경 손상, 척수 손상, 라이병, 길랑-바레 증후군, 리소솜 축적 장애, 예컨대 리포푸신증, 알파병, CNS 변성의 결과로서 현기증; 예를 들어, 좌위 소뇌 및 소뇌에서의 뉴런의 변성을 포함한, 만성 알콜 또는 약물 남용으로 인해 발생하는 병리상태; 인지 및 운동 손상을 유발하는 소뇌 뉴런 및 피질 뉴런의 변성을 포함한, 노화로 인해 발생하는 병리상태; 및 운동 손상을 유발하는 기저 신경절 뉴런의 변성을 포함한, 만성 암페타민 남용으로 인해 발생하는 병리상태; 초점성 외상, 예컨대 졸중, 초점성 허혈, 혈관 기능부전, 저산소-허혈성 뇌병증, 고혈당증, 저혈당증 또는 직접적 외상으로부터 초래된 병리학적 변화; 치료 약물 및 치료의 부정적 부작용 (예를 들어, NMDA 부류의 글루타메이트 수용체의 길항제의 항경련 용량에 반응한 대상 및 내후각 피질 뉴런의 변성)으로서 발생하는 병리상태, 및 베르니케코르사코프 관련 치매를 포함한다. 감각 뉴런에 영향을 미치는 신경변성 질환은 프리드라이히 운동실조, 당뇨병, 말초 신경병증 및 망막 뉴런 변성을 포함한다. 변연계 및 피질계의 신경변성 질환은 뇌 아밀로이드증, 픽 위축 및 레트 증후군을 포함한다. 상기 예는 포괄적인 것으로 의도되지 않고, 단지 용어 "신경변성 장애" 또는 "신경변성 질환"의 예시로서 제공된다.
- [0070] 본 발명의 방법은 또한 신장 질환과 연관된 장애의 치료에 유용하다. 이전에 신장에 주사된 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 신장 기능 및 세포 재생에 있어서 거의 즉각적인 개선을 생성하는 것으로 입증되었다. Resnick, Mayer, Stem Cells Brings Fast Direct Improvement, Without Differentiation, in Acute Renal Failure, EurekAlert!, August 15, 2005. 따라서, 본 발명의 ABCB5+ 줄기 세포는 신장 질환을 갖는 대상체에게 단독으로 또는 다른 치료제 또는 절차, 예컨대 투석과 조합하여 투여되어 신장 기능 및 세포 재생을 개선시킬 수 있다.
- [0071] 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있는 다른 질환은 각막 및 폐의 질환을 포함한다. 이들 조직에서의 치료용 ABCB5+ 줄기 세포의 투여에 기초한 요법은 긍정적 결과를 입증하였다. 예를 들어, 인간 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 손상된 각막을 재건하기 위해 사용되어 왔다. Ma Y et al., Stem Cells, August 18, 2005. 추가로, 골수로부터 유래된 줄기 세포는 폐 복구 및 폐 손상에 대한 보호에 중요한 것으로 밝혀졌다. Rojas, Mauricio, et al., American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, Vol. 33, pp. 145-152, May 12, 2005. 따라서, 본 발명의 ABCB5+ 줄기 세포는 또한 각막 조직 또는 폐 조직의 복구에 사용될 수 있다.

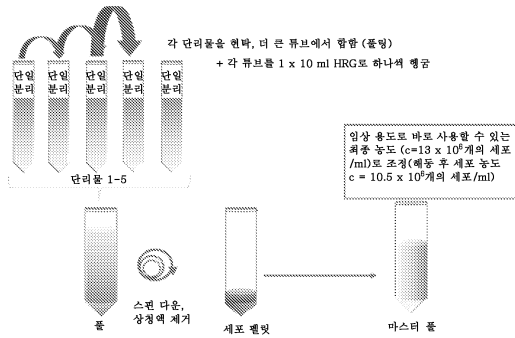
- [0072] 본 발명의 ABCB5+ 줄기 세포의 또 다른 용도는 조직 재생에 있다. 본 발명의 이러한 양상에서, ABCB5 양성 세포는 분화의 유도에 의해 조직을 생성하는데 사용된다. 단리 및 정제된 치료용 ABCB5+ 줄기 세포를 미분화 상태에서 특정 배지에서 유사분열 확장을 통해 성장시키고, 사용할 준비가 될 때까지 저장할 수 있다. 이어서, 세포는 해동되고 기계적, 세포적 및 생화학적 자극을 비롯한 다수의 인자에 의해 활성화되어 골, 연골 및 다양한 다른 유형의 결합 조직으로 분화된다. 인간 치료용 ABCB5+ 줄기 세포는 매우 다양한 중간엽 조직 세포 뿐만 아니라, 힘줄, 인대 및 진피를 생산하는 세포, 예컨대, 골모세포 및 연골세포로 분화될 수 있는 잠재능을 보유하고, 상기 잠재능은 단리 후, 및 배양물 중에서의 여러 집단 확장을 위해 유지된다. 따라서, 치료 ABCB5+ 줄기 세포를 단리하고, 정제하고, 크게 증식시킨 다음, 활성화시켜 목적하는 특정 유형의 세포, 예컨대 골격 및 결합 조직, 예컨대 골, 연골, 힘줄, 인대, 근육, 및 지방으로 분화시켜, 골격 및 다른 결합 조직 장애를 치료하는 과정이 존재한다. 결합 조직이라는 용어는 본원에서 특수 요소를 지지하는 신체의 조직을 포함하도록 사용되고, 골, 연골, 인대, 힘줄, 기질, 근육 및 지방 조직을 포함한다.
- [0073] 또 다른 측면에서, 본 발명은 결합 조직 손상을 복구하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 세포를 복구에 필요한 유형의 결합 조직으로 분화시키는 데 적합한 조건 하에서 줄기 세포를 결합 조직 손상 영역에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0074] 용어 "결합 조직 결함"은 외상, 질환, 연령, 출생 결함, 외과적 개입 등으로 인해 발생할 수 있는 정상 결합 조직과 비교하여 임의의 손상 또는 불규칙성을 포함하는 결함을 지칭한다. 결합 조직 결함은 또한, 예를 들어 미용적 확대를 위해 골 형성만이 요구되는 비-손상된 영역을 지칭한다.
- [0075] ABCB5+ 줄기 세포의 단일 단위 용량은 임의의 공지된 투여 방식에 의해 대상체에게 직접 투여될 수 있거나, 또는 시험관내에서 (이후에 생체내로 전달됨) 또는 직접 생체내에서 매트릭스 또는 임플란트 상에 시딩될 수 있다. 매트릭스 또는 임플란트는 중합체성 매트릭스, 예컨대 섬유성 또는 히드로겔 기반 장치를 포함한다. 치료용 ABCB5+ 줄기 세포가 연골 또는 골로 분화되기 때문에 이를 지지하기 위해 2가지 유형의 매트릭스가 통상적으로 사용된다. 매트릭스의 한 형태는 중합체성 메쉬 또는 스폰지이고; 다른 형태는 중합체성 히드로겔이다. 매트릭스는 또한 눈 조직에 전달될 수 있다.
- [0076] 매트릭스는 생분해성 또는 비-생분해성일 수 있다. 본원에 사용된 용어 생분해성은 약 25°C 내지 38°C의 온도를 갖는 pH 6-8의 생리학적 용액에 노출되면, 목적하는 적용에서 허용되는 기간, 약 6개월 미만, 가장 바람직하게는 약 12주 미만 내에 용해 또는 분해되는 중합체를 의미한다. 매트릭스는 예를 들어 1년 미만, 보다 바람직하게는 6개월 미만, 가장 바람직하게는 2 내지 10주의 기간에 걸쳐 생분해될 수 있다.
- [0077] 세포는 또한 히드로겔 용액과 혼합되고, 히드로겔의 경화 전에 세포를 이식하는 것이 바람직한 부위에 직접 주입될 수 있다. 그러나, 매트릭스는 또한 특정 적용에 적합하도록 성형되고 신체의 하나 이상의 상이한 영역에 이식될 수 있다. 본 출원은 특정 구조적 설계가 바람직한 경우 또는 세포가 이식될 영역이 세포의 성장 및 증식을 용이하게 하는 특정 구조 또는 지지체가 결여된 경우에 특히 관련된다.
- [0078] 세포가 이식될 부위 또는 부위들은 필요한 수의 세포처럼 개별적인 필요를 기초로 하여 결정된다. 외부 금형을 적용하여 주입된 용액을 성형할 수도 있다. 현탁액은 시린지 및 바늘을 통해, 벌침제가 요망되는 특정 영역, 특히 연부 조직 결함이 있는 곳에 직접 주사될 수 있다.
- [0079] 본원에 사용된 대상체는 인간, 비인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류이다. 인간 ABCB5+ 줄기 세포 및 인간 대상체는 특히 중요한 실시양태이다.
- [0080] 이상과 같이 본 발명의 적어도 한 실시양태의 여러 양상이 설명되었지만, 다양한 변경, 변형 및 개선이 관련 기술분야의 통상의 기술자들에게 쉽게 떠오를 것이라는 것을 알아야 한다. 이러한 변경, 변형 및 개선은 본 개시 내용의 일부인 것으로 의도되고, 본 발명의 취지 및 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 따라서, 상기 상세한 설명 및 도면은 단지 예이다.

도면

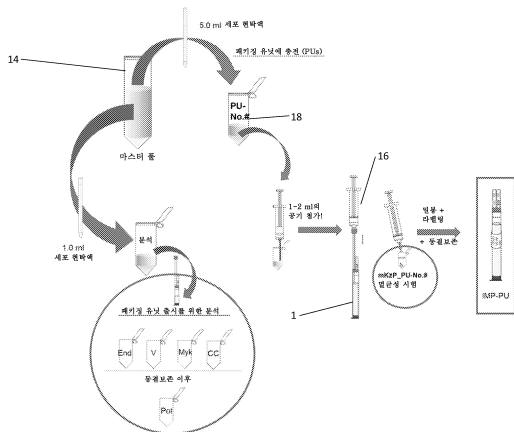
도면1a



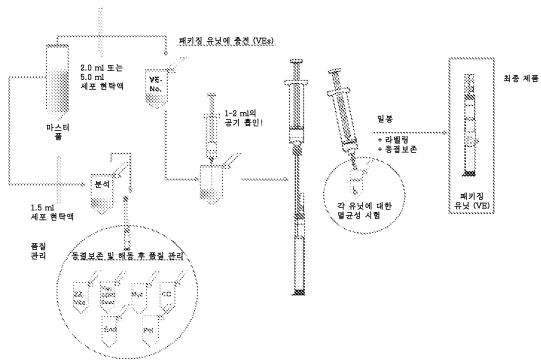
도면1b



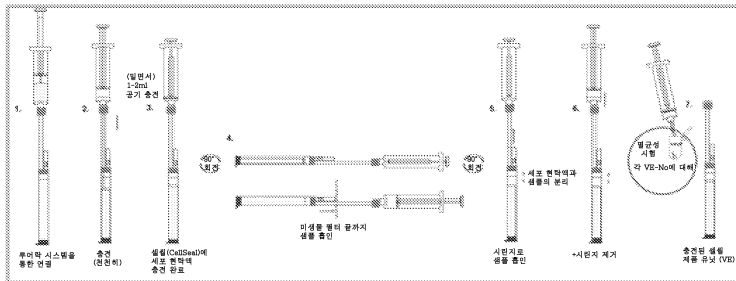
도면2a



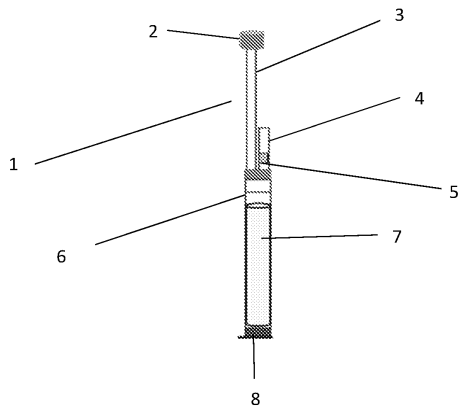
도면2b



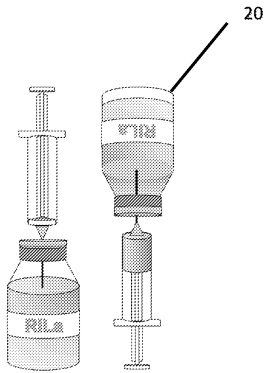
도면3



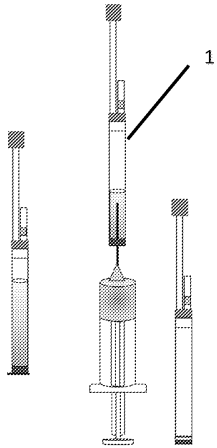
도면4



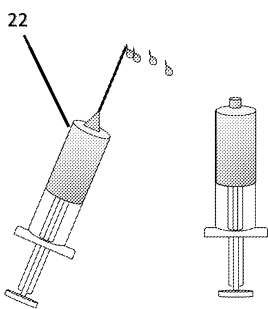
도면5a



도면5b



도면5c



도면6

