



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월31일

(11) 등록번호 10-1548783

(24) 등록일자 2015년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/16 (2015.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7023251

(22) 출원일자(국제) 2010년03월05일
심사청구일자 2013년05월08일

(85) 번역문제출일자 2011년10월04일

(65) 공개번호 10-2012-0002530

(43) 공개일자 2012년01월05일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2010/000882

(87) 국제공개번호 WO 2010/100570

국제공개일자 2010년09월10일

(30) 우선권주장

61/209,298 2009년03월05일 미국(US)

61/211,587 2009년04월01일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US6146890 A

(73) 특허권자

매크로큐어, 엘티디.

이스라엘 49250 페타치 티크바 키르얏 마탈론 베
어켓 스트리트 9 페.오. 박스 7988

(72) 발명자

시르반, 미첼

이스라엘 46432 헤르츨리야 텔 하이 스트리트 47
시나르, 에일랏이스라엘 예루살렘 메바세레트 지온 쇼셋 하야민
스트리트 16

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 양영환

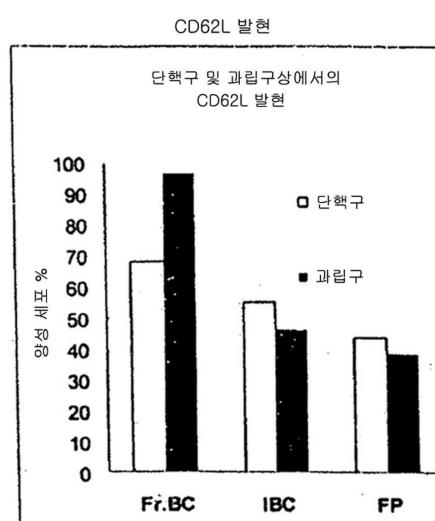
전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 활성화된 백혈구 조성물

(57) 요 약

치료의, 혈액 유도된 활성화된 백혈구 조성물, 이의 제조 방법, 및 상처의 치유를 교정 또는 촉진하기 위해 상기 조성물을 사용하는 방법을 개시한다.

대 표 도 - 도3a

(72) 발명자

프렌켈, 오리트

이스라엘 52621 텔 하쇼며 엠디에이

줄로프-사니, 아디

이스라엘 46432 헤르츨리야 에이나브 스트리트 10

부비스, 마리나

이스라엘 76303 르호봇 하나시에 하리순 스트리트
35

바인, 에일랏

이스라엘 76303 르호봇 데레 야븐 스트리트 74

지니스, 이렌

이스라엘 99557 베이트 세매쉬 하하다스 스트리트
16

특허청구의 범위

청구항 1

- a. 인간의 백혈구를 i) 12°C 내지 28°C의 온도에서 90분 내지 20시간 범위의 시간 동안, 또는 ii) 37°C 이하의 온도에서 5 내지 24시간 범위의 시간 동안 배양하는 단계;
- b. 백혈구를 저삼투압 (hypo-osmotic) 쇼크시키는 단계; 및
- c. 단계 b의 백혈구에 무기 이온, 유기 삼투물질, 또는 이들의 조합을 포함하는 생리학적으로 허용가능한 용액을 등장성을 회복시키는데 유효한 양으로 가하는 단계
를 포함하는, 활성화된 백혈구 조성물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

인간 혈장의 별도의 샘플을 응고제와 접촉시켜 혈청을 수득하는 단계, 여기서 백혈구와 혈장은 동일하거나 또는 상이한 공여자로부터 수득할 수 있음; 및

단계 c의 백혈구를 혈청과 혼합하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 백혈구는 O 음성 혈액형을 갖는 공여자로부터 수득된 것이고, 혈장은 AB 양성 혈액형을 갖는 공여자로부터 수득된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 저삼투압 쇼크는 백혈구를 물과 접촉시키는 것을 포함하며, 생리학적으로 허용가능한 용액은 염화나트륨 용액인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 약 37°C에서 혈청에서 백혈구를 배양하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

조성물 중 활성화된 백혈구의 40% 내지 90%는 과립성백혈구, 5% 내지 20%는 단핵구, 및 5% 내지 30%는 임파구를 포함하는,

제1항의 방법으로 제조되는, 상처 치유를 위한 활성화된 백혈구 조성물.

청구항 8

- a) 조성물은 400 mL 내지 550 mL의 혈액으로부터 유래된 100×10^6 개 이상의 백혈구를 포함함;
- b) 조성물은 활성화된 백혈구 조성물 내의 백혈구 세포의 총 수를 기준으로 하여 95% 이상의 생존 백혈구를 포함함; 및
- c) 조성물은 활성화된 백혈구 조성물 내의 총 과립성백혈구 집단에 대해 75% 이상의 CD11b(+) 과립성백혈구를 포함함

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 포함하는,

제1항의 방법으로 제조되는, 상처 치유를 위한 활성화된 백혈구 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 과립성백혈구의 약 52% 내지 약 78%가 호중구, 약 1% 내지 약 9%가 호산구, 및 약 1% 내지 약 2%가 호염기성백혈구를 포함하는 것인 조성물.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서, 임파구의 약 7% 내지 약 25%가 B 세포(CD19+), 약 20% 내지 약 30%가 NK 세포(CD3-/CD56+), 약 40% 내지 약 60%가 T 세포(CD3+), 약 0% 내지 약 30%가 NKT 세포(CD3+/CD56+), 약 8% 내지 약 20%가 T 조력 세포(CD4+/CD3+), 및 약 20% 내지 약 30%가 CD8+/CD3+ 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

제7항 또는 제8항의 활성화된 백혈구 조성물을 포함하는, 상처를 치료하기 위한 상처 치유 제제.

청구항 12

제7항 또는 제8항의 활성화된 백혈구 조성물을 포함하는, 상처를 치료하기 위한 약제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상처는 육창성 궤양, 압박성 궤양, 당뇨병 환자에서의 하지 궤양, 심부 흉골 상처, 수술후 상처, 몸통의 난치 수술후 상처, 대복재정맥의 수확 후 대복재정맥에의 상처, 외상에 의해 야기된 상처, 치열, 또는 정맥의 궤양인 약제.

청구항 14

제7항 또는 제8항의 조성물을 포함하는 드레싱.

청구항 15

제7항 또는 제8항의 조성물을 포함하는, 생리학적으로 불활성인, 재흡수성인, 또는 생리학적으로 불활성이고 재흡수성인 매트릭스 또는 스캐폴드.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

명세서**기술분야**

관련 출원의 교차참조

[0001] 본원은 "활성화된 백혈구 조성물"이란 제목하에, 2009년 3월 5일자로 출원된, 일련의 출원 제61/209,298호, 및 "혈관 장애용 활성화된 백혈구 조성물"이란 제목하에, 2009년 4월 1일자로 출원된, 일련의 출원 제61/211,587호의 우선권을 주장하며, 이들의 기재 내용은 여기서 참고로 인용된다.

배경기술

[0003] 상처 치유 과정은 백혈구로도 알려져 있는 백색 혈액 세포의 참여와 관련있다. 백혈구에는 림프구, 과립구 및 단핵구가 있다. 림프구 중 통상적인 타입의 3종은 T-세포, B-세포 및 자연 살생 세포이다. T-세포와 B-세포는 체내의 항원 인지에 있어서 중요한 역할을 한다 (Parkin, 2001). 자연 살생 (NK) 세포는 주요 조직적합성 복합체 (MHC)의 수준을 변화시킴으로써 감염된 세포를 확인하고, 감염된 세포를 파괴한다 (Moretta, 2008). 치유 과정에 있어서 림프구의 참여는 이들의 사이토킨과 성장 인자의 생산과 크게 관련되어 있다 (Keen, 2008). 새로운 부류의 감마-델타-T 세포가 피부에 존재한다고 기재되었다 (Jameson, 2002; Havran, 2005). 상이한 타입의 과립 구 중에는 호중구, 호염구 및 호산구가 있다. 단핵구는 대식세포로 분화되는데, 이는 조직 잔해물의 파괴 또는 외래 물질을 침범을 담당하고 있다. 대식구는 또한 염증을 조절하고 고치는 분자를 생산한다 (Riches, 1996).

[0004] 상처 치유 과정은 3개의 중첩 상으로 일어난다 (Li, 2007; Broughton, 2006; Tsirogianni, 2006; Singer, 1999; Martin, 1997). 제 1상은 염증상이다. 호중구가 사용된 다음, 이어서 염증 부위에 단핵구가 사용되는데, 여기서 이들은 세균을 사멸하고 식균함을 특징으로 한다 (Agaiby, 1999).

[0005] 증식상으로 알려진 제2 상처 치유 상은 새로운 육아조직을 형성시키는 것이다. 섬유아세포가 증식되어 상처 공간으로 이동한 다음 콜라겐과 기타 세포외기질의 성분을 합성한다 (Greiling, 1997). 동시에, 혈관형성이 일어나, 영양분과 산소를 대사적으로 활성인 새로운 육아조직에 공급한다 (Tonnesen, 2000). 본래의 표피로부터의 캐라틴세포가 임시 기질을 넘어 이동하여 증식하기 시작하며, 이 방법으로 새로운 상피 조직이 된다 (Kim, 1992).

[0006] 리모델링은 제3의 상으로, 상처 치유에 있어서 최종 상이다. 이는 섬유아세포가 근섬유아세포로 분화됨을 특징

으로 하며, 이는 접촉하여 상처 단부가 서로 더 밀착되도록 한다 (Tomasek, 2002). 분해 및 재-합성에 의한 콜라겐 섬유의 리모델링으로 콜라겐 섬유의 재-배향에 의해 상처가 강도를 얻게된다 (성장 인자에 의해 엄격하게 조정되는 과정) (Werner, 2003).

[0007] 당뇨병, 관상 동맥 질환 및 고혈압과 같은 복합 병리학 환자에 있어서 상처를 치료하는 것은 흔히 복잡하다. 이들 질환은 다양한 생리학적 상태로 인하여 혈관 합병증을 악화시키는 통상의 효과를 갖는다. 상처로부터의 합병증은 사망률과 사망을 증가시킬 수 있다 (Doshi, 2008).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 통상의 상처 치료법으로는 외과적인 괴사조직제거, 항생제 요법 및 여러가지 드레싱법이 있다 (Moran, 2008; Fonder, 2008). 통상의 치료에 내성인 상처를 난치성 상처라 언급하기도 한다. 이들 상처는 삶의 질을 떨어뜨리고 사망률과 사망을 증가시킬 수 있다. 따라서, 효과적인 상처 치유 조성물 및 방법에 대한 필요성이 지속되고 있다.

과제의 해결 수단

발명의 요약

[0010] 본 발명의 한 양태는 혈액으로부터 유래된 활성화된 백혈구 조성물 (ALC) (예를 들어, 전혈 샘플로부터 수득할 수 있거나 수득한 것)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 인간의 전혈 샘플로부터 수득할 수 있는 백혈구를 백혈구가 활성화되도록하는 기간 및 온도에서 (바람직한 구현예에서, 약 8 내지 약 20시간, 및 실온) 1차 배양시키는 단계를 포함한다. 배양 후, 백혈구를 멸균 중류수와 같은 생리학적으로 허용가능한 수용액과 접촉시켜 저-삼투압 (hypo-osmotic) 쇼크를 일으키고, 이어서 쇼크 상태가 된 백혈구를 생리학적으로 허용가능한 염용액과 접촉시켜 등장성을 회복시킨다. 상기 활성화된 백혈구 조성물 (ALC)은 치료적으로 사용할 수 있다. 그러나, 일부 구현예에서, 별도의, 실질적으로 백혈구의 1차 배양과 동시에, 동일하거나 상이한 전혈 샘플로부터 (즉, 동일하거나 상이한 인간으로부터) 수득할 수 있는 혈장 샘플을 백혈구 배양과 동시에 응고제와 약 37 °C에서 접촉시킨 다음 (바람직한 구현예에서, 약 8 내지 약 20시간), 응고된 혈장 샘플로부터 혈청을 분리시킨다. 백혈구를 상기 응고된 혈장 샘플로부터 수집한 혈청에 다시-현탁시켜, ALC를 형성시킨다. 상기 1차 배양 후, 백혈구를 약 60 내지 약 120분 동안 약 37 °C에서 추가로 2차 배양시킬 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 양태는 혈액으로부터 유래된 ALC에 관한 것이다. 본 발명의 활성화된 백혈구 조성물은 본 발명에서 백혈구 집단 면에서, ALC 중 백혈구 총수를 기준으로 하여, 과립구 약 40 내지 약 90%, 단핵구 약 5% 내지 약 20% 및 림프구 약 5% 내지 약 30%를 포함한다. 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 ALCs는 또한 예를 들어, CD11b에 의해 표시되는 바와 같이, 백혈구의 최소 수율 (전혈 샘플에 상대적으로), 백혈구의 생존률, 및 과립구의 최소 활성화 수준 면에서 특징화되고 공지의 조성물과 구별될 수 있다. ALC는 ALC의 잔여 수준의 혈소판 (약 $46.8 \pm 39.2 (10^3/\mu\ell)$ 의 양으로) 및 적혈구 세포 (약 $0.1 \pm 0.06 (10^6/\mu\ell)$ 의 양으로)를 추가로 함유할 수 있다. 림프구 집단은 B 세포 (CD19+) 약 7% 내지 약 25%, NK 세포 (CD3-/CD56+) 약 20% 내지 약 30%, T 세포 (CD3+) 약 40% 내지 약 60%, NKT 세포 (CD3+/CD56+) 약 0.1% 내지 약 30%, T 헬퍼 세포 (CD4+/CD3+) 약 8% 내지 약 20%, 및 CD8+/CD3+ 세포 약 20% 내지 약 30%를 포함할 수 있다. 상기 세포를 혈청 (이는 수용체에 대해 자가조직 또는 동종이계일 수 있다)과 같은 담체 또는 등장성을 회복시키기 위하여 사용되는 용액과 같은, 세포의 보관 및 투여에 적합한 일부 기타의 생리학적으로 허용가능한 이소-노말 (iso-normal) 액체에 현탁시킬 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는 ALC를 상처에 투여하거나 달리 도포하는 단계를 포함하는, 상처 치유의 촉진 방법에 관한 것이다.

[0013] 개시된 본 발명은 백혈구 세포를 함유하는 적어도 하나의 공지의 상처 치유 조성물과 비교하여 몇가지 놀라운 결과를 성취하였다. 명세서의 실시예에서 증명되는 바와 같은, 이들 결과로는 백혈구의 증가된 수율과 생존률 (WBCs), 및 과립구의 더 높은 퍼센트가 있다. 개시된 본 발명은 또한 예상치 못할 정도로 더 높은 퍼센트의 활성화된 단핵구 및 CD8 T-세포와 비교하여 상대적으로 더 높은 퍼센트의 CD4 T-세포인 것으로 생각된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 ALC 조성물을 생산하기 위한 대표적인 시스템의 제1 영역을 도식적으로 나타낸 것으로, 백 (bag) A-C (세트 1)를 포함하며, 이 백은 혈액 보관용 백 또는 용기로, 여기서 백 A는 공여자로부터 수집한 패킹된 적혈구 세포를 함유하며; 백 B는 혈장을 함유하고; 백 C는 백혈구 (이는 전혈 세포로부터 초기 분리한 다음 통상적으로 버피 코트로 불리우는 충을 형성한다)를 함유한다.

도 2는 본 발명의 ALC 조성물을 생산하기 위한 대표적인 시스템의 제2 영역을 도식적으로 나타낸 것으로 이는 RBC가 함유되어 있는 백 A를 시스템으로부터 제거하고 도 1로부터의 백 B와 C가 백 1 내지 5에 접합되어 있는 7-백 세트를 포함한다 (세트 -2).

도 3a 및 3b는 CD62L 과 CD42b 발현의 일반적인 경향을 설명하는 그래프로, 이들의 발현은 세포 활성화의 지표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에서 혈액은 전혈 또는 이의 구성 성분 (예, 혈장, 백혈구, 혈소판 또는 적혈구 세포)로 정의된다. 본 발명의 ALC에 존재할 수 있는 혈소판 및 적혈구 세포의 양은 전혈 중에 존재하는 양보다 더 적을 수 있다.

[0016] 여기서 사용되는 바와 같은 수치 중 하나 또는 모두와 함께 사용되는 용어 "약"은 허용가능한 범위의 편차, ± 0.5% 내지 ± 20% (및 이를 간의 수치, 예를 들어, ± 1%, ± 1.5%, ± 2%, ± 2.5%, ± 3%, ± 3.5%, ± 4%, ± 4.5%, ± 5%, ± 5.5%, ± 6%, ± 6.5%, ± 7%, ± 7.5%, ± 8%, ± 8.5%, ± 9%, ± 9.5%, ± 10%, ± 10.5%, ± 11%, ± 11.5%, ± 12%, ± 12.5%, ± 13%, ± 13.5%, ± 14%, ± 14.5%, ± 15%, ± 15.5%, ± 16%, ± 16.5%, ± 17%, ± 17.5%, ± 18%, ± 18.5%, ± 19%, ± 19.5%, 및 ± 20%)를 갖는 수치이다.

[0017] 본 발명의 ALCs를 생산하기 위한 출발 물질은 몇개의 공급원으로부터 수득할 수 있다. 전혈 또는 이의 성분 중 1종 이상 (예, 백혈구 및 혈장)은 자가조직 또는 동종이계 공급원으로부터 수득할 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에서, 혈액 샘플을 ALC로 마지막에 치료할 환자로부터 수집하는데, 이는 자가조직 혈액 샘플 또는 공급원이라 한다. 공급원(들), 즉, 혈액 또는 이의 성분을 의도된 ALC 수용체를 제외한 개체로부터 수득하는 구현 예(이를 동종이계 혈액 샘플 또는 공급원이라 한다)에서는, 이를 출발 물질을 혈액 은행으로부터 편리하게 수득할 수 있다. 샘플은 혈액형 (ABO, Rh), 적혈구 항원에 대한 불규칙한 항체, 및 수혈전파성 질환에 대해 혈액 은행에 의해 선별될 수 있다. 더욱 상세하게는, B, C형 간염, HIV 1/2, HTLV 및 매독에 대한 Abbott PRISM 장치를 사용하는 항체 (-HCV; HbsAg; 항-HIV 1/2 0+; 및 항-HTLV I/II)로 선별을 수행할 수 있다. 샘플을 또한 분자 방식 (NAT-Nucleic Acid Testing)으로 HIV, HCV 및 HBV에 대해 선별할 수 있다. 분자 선별법은 상업적으로 입수 가능한 도구, 예를 들어, Chiron으로부터의 TIGRIS 시스템을 사용하여 수행할 수 있다.

[0018] 동종이계 공급원을 수반하는 이들 구현 예에서, 샘플을 의도된 ALC 수용체와 동일한 혈액형을 갖는 공여자로부터 수득할 수 있다. 달리 또한 여기서 추가로 설명되는 바와 같이, 혈장 샘플을 AB+ 혈액을 갖는 공여자로부터 수득할 수 있으며 백혈구는 O-혈액을 갖는 환자로부터 수득할 수 있다. AB+ 혈액을 갖는 환자는 혈장에 대해 범용 공여자이며 O-혈액을 갖는 환자는 백혈구에 대한 범용 공여자이다. 공급원과 상관없이, 샘플(들)의 모든 필수적인 공정은 고도로 특수화된 장비 없이 수행할 수 있다.

[0019] 이제, 본 발명의 ALC 조성물의 바람직한 제조 방법을 도 1과 2를 참고로 하여 설명하는데, 이들 도면은 두 세트의 상호연결된 멸균 주입 백을 포함하는 시스템을 설명한다. 이 시스템은 밀봉하여 외부 환경에 노출되지 않도록 한다. 상세하게는, 두 세트를 연결하는 튜브를 서로 접합하여 Sterile Connecting Device (예, Terumo의 TSCD®-II Cat number ME-203AH)를 사용하는 하나의 시스템을 형성시킨다. 더욱 상세하게는, 멸균 기준을 준수하도록 하기 위하여, 튜브의 접합과 절단을 약 300 °C로 예열하는 특수 웨이퍼로 수행한다. 이런 고온은 접합 공정의 멸균성을 증가시킨다. 멸균성을 더욱 확실하게 하기 위하여, 접합을 클래스 100,000 봉쇄 영역내의 클래스 100 Biological Safety Cabinet에서 수행할 수 있다.

[0020] 이들 도면에서 설명되는 바와 같이, 상기 시스템은 백 A, B, 및 C를 포함하는, 두개의 멸균 백 세트, 세트 1을 포함하며, 수혈용으로 통상적으로 사용되는, 표준, 상업적으로 입수 가능한 삼중 백 세트이다. 인간의 혈액 샘플을, 전형적으로 약 400 내지 약 550 mL의 용적으로 정맥천자를 통하여 혈액 은액에서 수집하여 백 A로 옮긴 다음, 표준 기술을 사용하여 이의 성분들을 백 A, B 및 C로 분획화시킨다. 예를 들어, 혈액 샘플을 함유하는 백 A를 원심분리시킨다. 원심분리 후, 혈액 성분을 예를 들어, Baxter에 의해 제작된 혈액 성분 추출기를 사용하여 분리시킨다. 백혈구를 함유하는 버피 코트는 백 C에 넣고, 혈장은 백 B에 넣으며 적혈구는 백 A에 남겨둔다. 따라서, 이 공정의 결과로, 백 A는 패킹된 적혈구를 함유하며; 백 B는 혈장을 함유하고; 백 C는 백혈구 (및 가능

하계는 잔류 혈장 및 적혈구)를 함유하는 버퍼 코트를 함유한다. 달리, 당해 분야에 공지된 성분채집 기술을 통하여 전혈로부터 혈액 성분을 분리시킬 수 있다.

[0021] 이후 백 A를 상기 3개의 백 세트로부터 떼어낸다. 도 2에 설명되는 바와 같이, 백 B와 C를 주문 제작된 수혈용 백 1 내지 5 (세트-2)에 접합시켜 활성화된 백혈구 조성물의 제조에 사용되는 시스템을 형성시킨다. 상기 개시된 바와 같이, 멸균 연결 장치를 사용하여 결합을 수행한다. 백 1은 제1 수용액 (예, 멸균 중류수 200 mL)을 함유하며, 이는 버퍼 코트중 세포를 저삼투압 쇼크에 노출시킬 목적으로 사용된다. 이는 존재할 수 있는 잔여 백 혈구를 용해시키는 역할을 한다. 백 2는 제2의 용액 (예, 완충된 염화나트륨 용액 (8.91% NaCl, USP), 또는 무기 이온, 슈크로오즈와 같은 유기 삼투물질을 함유하는 기타 생리학적으로 허용가능한 용액, 또는 Lactated Ringers (Hartmans) 용액과 같은 이들의 조합물)을 함유하며, 이는 저삼투압 쇼크 이후 백혈구의 등장성을 회복시키는 역할을 한다. 염화나트륨 용액을 중류수 200 mL에 가할 경우, 0.9% NaCl 용액이 된다. 백 3은 제3의 용액 (예, 완충된 염화칼슘 용액 (1.17% CaCl₂ 이수화물, USP) 약 60 mL)을 함유하며, 이는 백 B중 혈장을 응고시켜, 혈소판과 혈청으로의 분리가 도모하는 역할을 한다. 백 4와 백 5는 각각 멸균 여과된 공기 약 60 mL와 약 500 mL를 함유한다. 상기 세트를 단일 유니트로 포장하고 고압 스팀을 사용하여 멸균시키는데, 이로써 환자에 대한 2차 감염의 위험성이 크게 감소된다.

[0022] 이어서 백혈구를 백 C로부터 백 4 (또는 백 5)로 옮겨 배양시키는데, 바람직하게는 수직 위치로 배양시켜 이들이 활성화되도록 한다. 본 발명의 목적에 있어서, 세포 활성화는 세포 (백혈구)가 활성화되도록 하는 과정, 더욱 상세하게는, 휴지기에서 기능적으로 활성인 상태 (이는 생물학적 활성 물질의 합성 또는 세포질로부터 미리-합성된 물질이 세포막으로 전파되거나 이들의 세포 외부로의 방출을 수반한다)로 전이되는 과정으로 정의된다. 이들 물질은 접착 분자, 사이토kin, 성장 인자, 효소, 전사 인자 및 세포 시그널화 수용체 및 매개체로 작용하는 단백질 또는 폴리펩타이드, 지질, 슈가, 산소 라디칼 및 기타 생화학적 잔기를 포함한다. 세포 내부 또는 세포 표면상에서 검출되거나 확인되는 경우, 이들 분자를 활성화 마커라 칭한다.

[0023] 일부 구현예에서, 백혈구를 단순히 실온에 정치시켜 배양한다. 본 발명의 목적에 있어서, 실온은 약 12 °C 내지 약 28 °C 범위의 온도를 언급하며, 일부 구현예에서 약 16 °C 내지 약 25 °C를 언급한다. 배양 시간은 온도에 따라 변화될 수 있다. 배양 시간은 증가된 온도에서 더 낮아진다. 백혈구를 활성화시키는데 필요한 배양 시간은 배양이 수행되는 온도에 거의 반비례한다. 예를 들어, 백혈구를 실온에서 정치시키는 구현예에서, 배양 시간이 일반적으로 약 90 분에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8시간 내지 약 20시간 까지의 범위이다. 바람직한 구현예에서, 배양 시간의 범위는 약 8 내지 약 20시간 이다. 더욱 바람직한 구현예에서, 백혈구의 배양은 약 18 °C 내지 약 24 °C에서 약 8시간 내지 약 12시간이다. 다른 구현예에서, 백혈구의 배양은 이들을 열, 예를 들어, 실온 이상의 온도 내지 약 37 °C 이하의 온도에 노출시키는 것을 포함한다. 승온에서의 배양 시간의 범위는 일반적으로 5시간 내지 약 24시간이다.

[0024] 다시 도 2를 참고로, 백 C 중의 백혈구를 백 4로 옮기는데, 백 4는 전형적으로 백 C보다 작다 (예를 들어, 약 250 mL - 500 mL). 또한, 세포를 다른 500 mL 백 (백 5)으로 옮길 수 있다. 백혈구가 활성화되도록 하기 위하여, 백 4 (또는 백 5)를 수직 위치에 놓고 실온에서 약 8 내지 약 20시간 동안 배양시킨다.

[0025] 배양 후, 백혈구를 저삼투압 쇼크시킨데, 이로서 백혈구가 용해된다. 바람직한 구현예에서, 저삼투압 쇼크를 즉시 수행한다 (즉, 선행 단계 완결 시 중간체류 단계없이 또는 불필요한 지연없이, 전형적으로는 2분 미만). 저삼투압 쇼크는 백혈구를 함유하는 백 1 내지 백 4 (또는 백 5)로부터 중류수를 이동시킴으로써 개시될 수 있다. 저삼투압 쇼크 처리는 전형적으로 약 45초간 수행된다. 이 단계 이후, 바람직하게는 이후 즉시, 백 2 내지 백 4 (또는 백 5)로부터 염화나트륨 용액을 이동시켜 백혈구의 등장성을 회복시킨다. 염화나트륨 용액 대 세포 혼탁액의 용적 비는 일반적으로 약 1:10이다. 이어서 백 4의 내용물을 백 1 (또는 백 5의 원쪽)로 옮기는데, 이 백의 용적은 백 4의 용적보다 더 크다. 상기한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법에서 치료적으로 사용될 수 있다.

[0026] 바람직한 구현예는 적어도 1개의 추가 단계를 포함한다. 따라서, 백혈구 배양과 동시에 수행될 수 있는, 별도의 단계로, CaCl₂와 같은 응고제를 사용한 다음, 원심분리시켜 혈장을 혈소판과 혈청으로 분리한다. 따라서, 상기 대표적 구현예에서, 백 3으로부터의 CaCl₂를 백 B로 옮긴다. 이제 혈장과 CaCl₂의 조성물을 함유하는 백 B는 전형적으로 약 37 °C의 온도에서 응고시킨다. 백혈구를 배양시키는 시간과 실질적으로 동일한 시간 동안 혈장을 응고제와 접촉시킨다.

[0027] 백혈구의 저삼투압 쇼크 및 등장성 회복, 및 이어서 백 4의 내용물을 백 1로 옮기고 (또는 백 5에 남겨두고, 백

B 중 혈장을 응고시킨) 후, 전체 7-백 시스템을 원심분리시킨다. 바람직한 구현예에서, 원심분리는 백혈구를 백 1로 옮긴 후 (또는 백 5에 남겨둔 채) 즉시 수행하여, 세포가 용혈물에 노출되지 않도록 한다. 원심분리 후, 백 1 (또는 백 5)로부터의 상등액을 백 C로 옮기고, 원심분리 결과 백 1 (또는 백 5)에 형성된 백혈구 펠릿을 백 B로부터의 혈청 약 20 ml 내지 약 50 ml에 다시 혼탁시킨다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예의 또 다른 단계에서, 활성화된 백혈구를 최종 조성물로 제조하기 전에 상기 언급한 응고된 혈장에서 배양시킬 수 있다. 일반적으로, 상기 2차 배양 기간은 37 °C에서 약 1 내지 2시간 동안 수행한다.

[0029] 다른 구현예에서, ALC 조성물을 더 작은 용적의 혈액 샘플로부터 제조할 수 있으며, 이는 모든 용액의 용적을 감소시키며 더 작은 백을 사용토록 한다. 또한, 이들 상이한 크기의 백을 사용함으로써 상이한 조성을 갖는 ALCs가 생산된다. 심지어 이들 구현예에서, 동종이게 또는 자가조직 혈액 샘플을 출발 물질로 사용할 수 있다. 더 작은 용적을 사용함으로써 달리 건강한 면역 시스템을 갖고 있지만 일정 타입의 대단히 쇼크적인 상처로 고생하는 환자를 치료하는 응급 상황 (예, 전쟁터 및 전투 상황)에서와 같이, 외부 혈액 은행을 사용하지 않고, 자가조직적으로 혈액을 수집하는 능력을 갖는 임상의를 제공한다. 이들 구현예에서, 감염성 질환 및 항원에 대한 시험이 면제될 수 있다. 그러나, 그러한 경우, 난치성 상처가 있는 환자는 유효한 ALC 제조를 위하여 임상적으로 허용될 수 있는 혈액 공여자가 아니다. 이런 상황이 발생할 경우, ALC는 여기 기재된 방법으로 동종이계 공여자로부터 생산한다.

[0030] 본 발명의 ALCs는 백혈구, 예를 들어, 과립구, 단핵구 및 림프구를 포함한다. 과립구는 호중구, 호산구 및 호염구를 포함한다. 광의적인 의미로, ALC의 백혈구 집단은 일반적으로 과립구 약 40% 내지 약 90%, 단핵구 약 5% 내지 약 20% 및 림프구 약 5% 내지 약 30%를 포함한다. 특정 양의 세포를 사용되는 분석 기술을 기본으로 하여 나눌 수 있다. FACS를 사용하여 분석을 수행할 경우 (예를 들어, 측면-산란 대 전방 산란 도트 플롯 분석법을 사용), 백혈구 조성물은 일반적으로 과립구 약 55% 내지 약 80%; 단핵구 약 5% 내지 약 15% 및 림프구 약 5% 내지 약 30%를 함유하며, 일부 구현예에서, 과립구 약 58 내지 76%; 단핵구 약 5 내지 11% 및 림프구 약 9 내지 23%를 포함한다. Cell Dyn Analyzer을 사용하여 분석을 수행할 경우, 백혈구 조성물을 일반적으로 과립구 약 50% 내지 약 90%; 단핵구 약 5% 내지 약 15%; 및 림프구 약 10% 내지 약 25%를 함유한다. ALC 중 림프구 아집단은 다음과 같은 일반적인 범위의 세포를 확인할 수 있다: B 세포 (CD19+) 약 7% 내지 약 25%; NK 세포 (CD3-/CD56+) 약 20% 내지 약 30%; T 세포 (CD3+) 약 40% 내지 약 60%; NKT 세포 CD3+/CD56+ 약 0.1% 내지 약 30%, T 헬퍼 세포 (CD4+/CD3+) 약 8% 내지 약 20%, 및 CD8+/CD3+ 세포 약 20% 내지 약 30%. 바람직한 구현예에서, 림프구 아집단은 적어도 9%의 CD56+ 세포 (CD3-/CD56+; CD3+/CD56+; CD3+/CD56+/CD8+)로 강화되며, T 헬퍼 림프구 (CD4+/CD3+)의 양은 20% 미만으로 감소되고, T-헬퍼 대 T-억제 세포의 비율 (CD4+/CD3+:CD8+/CD3+)은 0.8 미만이다.

[0031] 상처로 고생하는 환자는 생리학적으로 손상된 상태일 수 있거나 달리 건강한 상태일 수 있다. 예를 들어, 이미 손상된 대사 시스템으로 인하여, 당뇨병 및 기타 의과적으로 손상된 환자는 그들 자체의 백혈구가 공정에 적합하지 않을 수 있기 때문에, 이종성 혈액으로부터 유래된 ALC에 대한 후보이다. 그러나, 외상 환자의 경우에서와 같이, 달리 건강한 환자는 본 발명의 ALC 조성물에 대해 좋은 후보이다.

[0032] 본 발명은 다양한 정도의 상처 치료를 촉진하는데 유용한다. 실시에 있어서 다른 치료 양식과 함께 사용할 수 있지만, 효과적인 상처 치유를 성취하는데 이들이 필요하지 않을 수 있다. 본 발명자들은 어떠한 타입의 상처에라도 ALC를 적용할 수 있을 것으로 생각하며 치료할 수 있는 타입의 상처에 대한 제한이 없을 것으로 예측하고 있다. 예를 들어, 표준 주사기 또는 유사한 적용 수단을 사용한, 적용의 용이성으로 인하여 본 발명의 ALC 조성물은 사용하기에 안전하고 용이하다.

[0033] 본 발명으로 치료할 수 있는 상처는 전형적으로 생체 조직의 자상, 창상 또는 열상의 형태이다. 피부의 상처는 표피, 진피 또는 완전-두께 상처의 경우, 피하 조직을 관통할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물 및 방법으로 치료할 수 있는 대표적인 타입의 상처로는 육창성 또는 암박성 궤양; 당뇨성 궤양, 예를 들어, 개심술 이후 심부 흉골 상처 (관상 재혈관화 및 대복재정맥의 수화 후 대복재정맥); 및 복부 및 기타 다른 타입의 수술 이후 수술후 상처가 있다. 기타 상처는 총, 칼, 또는 기타 피부에 절단 또는 찢어짐을 일으킬 수 있는 물체에 의한 것과 같은 외상으로부터 발생되는 것들이 있다. 구강 (예, 치아)의 상처, 뿐만 아니라 치료의 부작용 또는 여러 가지 병리 증상 (예, 카포시 육종과 관련된 통증)으로 발생되는 상처가 있을 뿐만 아니라, 내부 상처 (예, 치열, 및 위장관으로의 상처 또는 병소, 예로서, 위 또는 장에서의 궤양)를 또한 본 발명으로 치료할 수 있다.

[0034] ALC를 또한 사용하여 혈관 장애에 의해 악화된 상처를 치료할 수 있다. 본 발명의 목적에 있어서 혈관 장애란

통증받는 영역으로의 불충분한 관류를 일으키는 부적합한 혈액 순환을 언급한다. 그러한 장애는 외상 (예, 골절에 인접한 혈관 손상), 또는 다양한 병리 (예, 당뇨병 및 동맥경화증)에 의해 유발될 수 있다. 다른 예로, 외상 또는 질병이 유발되는 경우, 혈관 장애는 효과적인 상처 치유의 가능성을 감소시킨다. ALC는 이런 환자에서의 상처 치유 성과를 개선하는데 유용할 수 있으며 여기에 기재된 방법에 따라서 투여되어야 한다. 또한, 치료 알고리즘은 상처의 삼화도와 타입, 또는 혈관 장애의 정도에 의해 제한되어서는 안된다. ALC는 가장 심한 상처와 혈관 장애가 있는 환자에서 더욱 효과적일 수 있다.

[0035] 일반적으로, 활성화된 백혈구 조성물의 적용은 ALC를 상처 또는 상처를 둘러싸고 있는 조직으로의 직접적인 1회 이상의 주사로 수행된다. ALC는 개방된 상처에 직접 적용할 수 있다.

[0036] 상처로의 주사의 경우, Luer-Lock 주사기 또는 주사기와 바늘 사이의 잠김 메카니즘을 갖는 상업적으로 입수가 가능한 주사기를 사용하는 것이 바람직하다. 상처, 특히 암박성 상처의 생물학적 공간은 흔히 제한된다. 상처에 주사할 때, 주사기를 바늘로부터 분리시키는 압력의 위험이 있다. 잠김형 주사기를 사용함으로써 이런 위험을 없앨 수 있다.

[0037] 상처 조직으로의 주사가 불가능할 경우, ALC를 상처의 공동에 직접 적용할 수 있다. 이 방법에 의한 적용은 주사기 또는 튜빙을 사용한 직접적인 도포법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0038] ALC는 드레싱을 보조적으로 사용하면서 상처 부위에 또는 그 주변에 적용시킬 수 있다. 건식 드레싱으로는 거즈 및 밴드, 비-접착성 메쉬, 멤브레인 및 호일, 포움, 및 조직 접착제가 있다. 수분-보호층 드레싱으로는 페이스트, 크림 및 연고, 비투과성 또는 반-투과성 멤브레인 또는 호일, 하이드로콜로이드, 하이드로겔, 및 복합 제품이 있다. 생리활성 드레싱으로는 항균성 드레싱, 상호작용성 드레싱, 단일-성분 생물학적 드레싱, 및 복합 제품이 있다. 일부 구현예에서, 상처를 ALC에 담근 멸균 거즈로 패킹한다. 예를 들어, 멸균 거즈 패드와 같은 드레싱을 Lactated Ringer (Hartman) 용액, 알기네이트 함유 드레싱, 폴리우레탄 드레싱 또는 카복시메틸셀룰로오스 드레싱과 같은 조성물로 포화시킬 수 있으며, 이것으로 상처를 커버하여 적용한 다음, 건식 드레싱을 사용한다. 해당 상처가 고도로 감염된 경우, Silverlon과 같은 은(sliver) 드레싱을 적용시킬 수 있다. 주사후 드레싱의 선택은 임상의 결정을 기본으로 한다. 상업적 입수가능성, 과거 임상적 성공 역사, 및 환자의 내성이 상처 드레싱을 선택하는데 있어서 고려해야 할 모든 인자이다. 드레싱은 주기적으로, 예를 들면, 전형적으로 약 24시간 후 제거하여 예를 들어, 멸균수 및 비누로 상처를 자극할 수 있다.

[0039] 또 다른 구현예에서, 본 조성물을 생리학적으로 불활성 및(또는) 재흡수성 매트릭스 또는 스캐폴드 (예, 콜라겐) 상에 놓고 프레스 팅을 사용하여 상처에 삽입할 수 있다. 이는 ALC의 상처 부위로의 방출을 지연시켜 세포가 동일계에서 더 긴 기간을 갖게 되는 이점을 환자에게 제공한다.

[0040] ALC 조성물은 1회 또는 1회 이상, 예를 들어, 4주 후, 임상의가 추가의 적용이 필요할 것인지에 대해 결정함에 따라 적용시킬 수 있다. 고려할 수 있는 인자로는 증가된 상처 치수 (폭, 길이 및 깊이), 화농, 발열 또는 재-치료가 요구되는 잘 듣지 않는 감염을 나타내는 증상이다. 재-치료 외에, 외과적 피사조직제거에 대한 추천은 임상의가 적절하다고 생각하는 점에서 표시할 수 있다.

[0041] ALC는 짧길 (치료적 가열), 전기적 자극, 자성, 레이저 광요법, 사이클로이드 진동 요법 및 초음파와 같은, 다른 통상의 상처 치료법과 함께 사용할 수 있다. 또한, 라바 요법, 피부 대용물, 배양된 케라틴세포 (Epicel, Genzyme biosurgery), 인간의 피부 대체체 (Dermagraft, Smith and Nephew Inc.), 시체 유래 가공된 진피 (Alloderm, Life Cell Corporation), Bilayered Skin Equivalent (Apligraf, Organogenesis Inc.), TransCyte (Smith and Nephew Inc.), Growth Factors (PDGF는 현재 국소용으로 허가된 성장 인자 만이다), 및 피브린 봉합제와 같은 생물학적 요법과 함께 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, ALC를 VAC와 함께 사용하는데, 이는 KCI에 의해 생산되는 상업적으로 입수가능한 상처 치료법이다. VAC는 상처에 음성 압력을 인가하여 상처 치유를 증진시킨다. 이를 구현예에서, ALC는 VAC 요법 전에 상처에 적용하는 것이 바람직하다. 또 다른 구현예에서, ALC를 고압성 요법 (hyperbaric therapy; Thackham, 2008)과 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, 환자가 고압성 요법을 받기 전에 ALC를 상처에 적용시킬 수 있다. ALC를 또한 저-에너지 쇼크파 요법 (예, 상처 길이 cm 당 약 0.1 mJ/mm²의 쇼크; 5 Hz)과 함께 사용할 수 있다. 예를 들어, 다음 문헌을 참조한다: Dumfarth, et al., Ann. Thorac. Surg. 86:1909-13 (2008).

[0042] 치료 후, 상처를 길이, 폭 및 높이 측정으로 평가할 수 있다. 전형적으로, 이들 인자의 모든 측정치가 무시할 정도일 때 상처가 치유된 것으로 간주된다. ALC는 또한 진통 효과를 제공할 수 있다.

[0043] 본 발명의 활성화된 백혈구 조성물은 당뇨성 발 케양 및 유향성 케양을 포함하는 상처에 특히 유용하다. 유향성

궤양은 통상적으로 특정 부위에서의 장기간 압력으로 인한, 지연된 혈류에 의해 발생하는 암박성 궤양이다 (Berlowitz, 2007). 육창성 궤양은 연세드신 분들에서의 사망률과 사망을 일으킨다. 단계 IV 암박성 육창의 적어도 48%는 치료 1년 후에도 치료되지 않은 상태로 남아있다 (Girouard, 2008). 육창으로 고생하는 환자는 통상적으로 당뇨 및 고혈압과 같은 동반 병리를 갖는다. 이를 병리는 또한 육창의 성공적인 치료를 어렵게 한다.

[0044] 육창성 궤양을 치료하는 일 구현예에서, 조성물을 18-케이지 (18G) 바늘을 사용하는, 크기의 멀균 주사기에 흡입시킨다. 흡입은 천천히 수행하여 세포에 대한 손상을 최소화한다. 주사기와 바늘의 크기가 제한이 없을 경우, 흡입에는 큰 케이지의 바늘이 바람직하다. 이는 전달을 용이하게 하고 세포 손상을 감소시킨다.

[0045] 활성화된 백혈구 조성물을 궤양에 적용시키는 것은 조성물을 상처에 주사하는 것을 포함한다. 주사기 내에 전체 샘플을 배치하고 임상의는 임상적 인자를 기본으로하여 필요하다고 결정할 경우 추가의 ALC를 투여할 것을 선택할 수 있다.

[0046] 흡입에 사용되는 18G 바늘은 22 내지 35G 크기 범위의 바늘로 교환할 수 있다. ALC는 다양한 위치에서 상처에 주사될 수 있다. 일 구현예에서, 상처의 전체 길이에 대해 약 1 cm 마다 내지 약 3 cm 마다 주사할 수 있다. 각 주사 부위에, 0.1 내지 0.3 ml의 ALC를 주사한다.

[0047] 또 다른 구현예에서, 전체 주사기를 상처내의 단일 부위로 한번에 주사할 수 있다. 이제, 본 발명의 양태가 다음과 같은 비-제한 실시예에 따라서 기재될 것이다.

실시예 1 - 세포 활성화의 분석

[0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따라서 제조된 활성화된 백혈구 조성물을 다양한 세포 표면 마커의 분석에 의해 정량 분석한다. 단핵구 또는 과립구와의 혈소판 응집에서 증가는 P 세라틴의 발현을 통한 단핵구와 과립구의 활성화 징후이다. CD62L은 혈장막 단백질로 이는 활성화 중 흘러 세포 활성화에 따라 감소된다. CD42b는 응집 인자로서 응고 과정에 연루된 혈소판 활성화 마커이다. 이는 세포외 매트릭스 뿐만 아니라 접착 분자와 상호작용하며 또한 단핵구와 과립구 활성화의 지표로서 본 발명에서 사용된다.

[0050] 세포를 3개의 시점에서 채취한다: 신선한 버피 코트 (Fr. BC); 배양된 버피 코트 (IBC); 및 최종 활성화된 백혈구 조성물 (FP) (표 1).

표 1

백혈구 활성화를 나타내는 세포 표면 마커

CD62L 양성 세포의 %			
	Fr.BC	IBC	FP
단핵구	68	55	44
과립구	97	47	39
CD42b 양성 세포의 %			
단핵구	26	74	92
과립구	3	15	39

[0052] 버피 코트를 제조한 후 즉시 Fr.BC를 취한다. 1차 배향 후 IBC를 취하고 FP는 최종 생성물로부터 취한다. 각 시점에, 세포를 특이적인 모노클로날 항체 (알로피코시아닌 (APC) 접합된 항-CD14, 피코에리트린 (PE) 접합된 항-CD42b, 및 형광-이소티오시아네이트 (FITC) 접합된 항-CD62L 항체)로 표지한 다음 FACS로 분석한다.

[0053] 각 시점으로부터의 세포를 FACS 착색 용액 (PBS, 2% Normal Mouse Serum; 0.02% 나트륨 아지드)으로 세척하고, 분취량을 취하여 착색 프로토콜에 따라서 착색한다. 간략하면, $0.5 \times (10^6 / \mu\text{l})$ 세포를 적절한 모노클로날 항체와 30분 동안 실온 (RT)에서 또는 4 °C 암실에서 배양시킨다. 배양 후, 세포 조성물을 적혈구 용해 완충액으로 처리하고, 세척한 다음, 최종적으로 FACS 수집을 위하여 PBS에 다시 혼탁시킨다. CD62L, 양성 (+) 착색의 경우, 세포 조성물을 항-인간의 CD14 (APC) 및 항-인간의 CD62L (FITC) 항체와 함께 +4 °C에서 배양시킨다. CD42b+ 착색의 경우, 세포 조성물을 항-인간-CD14 (APC) 및 항-인간 CD42b (PE)와 함께 실온 (RT)에서 배양시킨다. 음성 대조군 세포 조성물은 항-인간-CD14 및 적절한 동형 대조물과 함께 관련 조건하에서 배양시킨다. FACS CALIBUR (Becton Dickinson)을 사용하여 세포-관련 광 산란 및 형광을 분석한다. 단핵구는 CD14 양성 세포로 결

정되며 과립구는 이들의 특징적인 광 산란 특성으로 확인된다. CD62L 또는 CD42b 양성 세포는 적절한 동형 대조군 항체와 함께 배양시킨 단핵구 및 과립구에 의해 측정된 바와 같이, 역치 보다 더 큰 형광을 갖는 단핵구와 과립구의 퍼센트로 정의된다.

[0054] 도 3a 및 3b 및 표 1에 나타낸 바와 같이, 결과는 CD62L 발현이 활성화가 진행됨에 따라 감소하고 CD42b는 활성화가 진행됨에 따라 증가할 것이라는 예측과 일치하였다. 이를 데이터는 백혈구가 활성화되었음을 증명한다.

실시예 2 - 활성화된 백혈구 조성물의 분석

표 2와 3은 Cell Dyn 분석기를 사용한 분석에 의해 측정되는 바와 같이 최종 ALC의 세포 조성물을 설명한다. 활성화된 백혈구를 혈청에 다시 혼탁시킨 후 세포를 분석한다. 생존성 세포를 트리판 블루 배제법을 사용하여 착색시키고 현미경하에서 관찰한다.

표 2

활성화된 백혈구 조성물의 조성

	혈소판 ($10^3/\mu\ell$)	적혈구 ($10^6/\mu\ell$)	백혈구 ($10^3/\mu\ell$)
최종 ALC 중 농도	46.8	0.1	6.8
표준 편차	39.2	0.06	3.8

표 3

ALC 중 백혈구 조성

백혈구					
	과립구				
	중성구	호염구	호산구	단핵구	림프구
최종 ALC 중 %	65.5	1.6	4.6	9.1	18.5
표준 편차	8.2	0.3	3	2.1	4.1
범위	52~78	1~2	1~9	6~12	13~24

표 2에 나타낸 바와 같이 Cell Dyn 결과는 ALC가 혈소판을 $46.8 \pm 39.2 (10^3/\mu\ell)$ 의 양으로, 적혈구를 $0.1 \pm 0.03 (10^6/\mu\ell)$ 의 양으로, 그리고 백혈구를 $6.8 \pm 3.8 (10^3/\mu\ell)$ 의 양으로 함유함을 나타낸다. Cell Dyn 분석을 기분으로 하여, ALC의 백혈구 조성물이 (표 3에 나타낸 바와 같이) 표준 편차를 고려하여, 호중구 52 내지 78%, 호염구 1 내지 2%, 호산구 1 내지 9%, 단핵구 6% 내지 12%, 및 림프구 13% 내지 24%를 함유하는 것으로 결정되었다. 이를 표에 제시된 범위는 Cell Dyn 분석기를 사용한 8회의 별개의 분석 후 높은 결과와 낮은 결과를 나타낸다.

실시예 3

본 발명의 방법과 선행 기술 방법 간의 비교

본 발명과 관련한 여러 가지 예측하지 못한 장점을 부각시키기 위하여, 이들의 구현예들을 미국 특허 제 6,146,890호 ("Danon")에 개시된 방법과 비교한다.

본 발명의 구현예

도 1과 2를 참조하여, 전혈을 주요 성분, 즉, 적혈구 세포, 혈장, 및 베피 코트로 분리시킨 후 즉시, 베피 코트를 백 C로부터 백 4로 옮겨 12시간 ± 2시간 동안 실온에서 배양시킨다. 이 단계에 이어서 저삼투압 쇼크 처리를 수행하기 위하여 (이로써 용혈물이 생산된다) 백 1로부터 증류수를 백 4 (또는 백 5)로 옮긴다. 이 처리는 대략 45초 동안 수행한다. 이후 즉시, 백 2에 포함되어 있는 완충된 염화나트륨 용액을 베피 코트 (백혈구)의 등장성을 회복시키기 위하여 백 4 (또는 백 5)로 옮긴다.

[0065] 상기 벼피 코트의 배양과 동시에, 백 3의 완충된 염화나트륨 용액을 혈장을 응고시킬 목적으로 혈장을 함유하는 백 B로 끓긴다. 이로써 12시간 ± 2시간에 걸쳐, 또한 추가로 짧은 시간 동안 백혈구를 저삼투압 쇼크시킨 다음 등장성을 회복시킨다.

[0066] 등장성이 회복된 다음 즉시, 백 어셈블리 전체를 원심분리 (전형적으로 약 8 내지 약 10분)시킨 다음, 용혈물로부터 세포를 분리시킨다. 그렇게 할 때, 세포가 최소 기간 동안, 즉, 대략 10분간 용혈물 영향에 노출된다. 원심분리시킨 다음, 백 1 (또는 백 5) 중의 용혈물의 상등액을 버리고, 신선한 배지를 백 1 (또는 백 5)에 가한 다음, 약 1 내지 2시간 동안 37 °C에서 배양시킨다. 배양시킨 다음, 세포를 단일 단계로 세척한다.

비교 (선행기술) 공정

[0068] Danon에 교시에 따라서, 전혈을 가공하고 이를 3종의 주요 성분, 즉, 적혈구 세포, 혈장, 및 벼피 코트로 분리시킨 이후 즉시 벼피 코트를 저삼투압 쇼크시킨다. 따라서, 본 발명과 정확히 비교하면, Danon의 방법은 주 혈액 성분으로 분리시킨 후 및 벼피 코트를 저삼투압 쇼크시키기 전에 배양시키는 단계를 포함하지 않는다. 저삼투압 쇼크는 벼피 코트가 백 PB₃에 포함되어 있는 동안 수행한다.

[0069] 별개의 단계로, 저삼투압 쇼크 이후, 완충된 염화칼슘 용액을 백 PB₆으로부터 백 PB₂로 옮기고 (백 PB₂는 혈장을 함유한다), 이어서 PB₂중의 혈장을 10분간 심부-동결시킨 다음, 이를 37 °C 수조에 추가로 30분의 배양 기간 동안 놓는다. 이 기간 동안, 저삼투압 쇼크시킨 벼피 코트 분획을 정치시키며 백혈구가 용혈물에 노출된 상태로 있게 된다.

[0070] 상기 응고 과정을 완결한 다음 (이는 전체적으로 약 40분간 지속된다), 전체 백 시스템을 원심분리시키고, 용혈물을 버린다. 따라서, 세포가 적어도 약 55분간 (즉, 혈장 응고와 동시에 일어나는 40분간의 정치 기간 및 원심분리를 위한 추가의 15분) 용혈물에 노출되게 된다. 대조적으로, 본 발명의 방법에서는, 백혈구를 즉시 약 5분간 원심분리시켜 훨씬 더 짧은 시간 동안, 즉, 10분 미만 동안 용혈물에 노출되게 된다.

[0071] PB₃으로부터 상등액을 버린 다음, 신선한 배지를 거기에 가한 다음, 전체 혼탁액을 PB₇로 다시 옮기고, 이어서 약 17시간 동안 37 °C에서 배양시킨다. 배양 후, 세포를 3회 세척한다. 대조적으로, 본 발명의 구현예에서, 배양 기간을 응고된 혈장에서 1 내지 2시간 동안 수행하고 단 1회만 세척한다.

[0072] 상기 언급한 배양을 수행할 때 까지, 모든 선행 단계를 주입 백에서 수행하며, 주입 백에는 전혈이 수집되어 있다. 대조적으로, 본 발명의 구현예에서 염수와 같은 정맥 용액을 투여하는데 통상적으로 사용되는 주입 백을 사용한다.

[0073] Danon의 방법을 4회 수행하여 본 발명의 구현예에서 얻은 결과와 비교한다. 하기한 바와 같은 결과는 평균이다.

결과

[0075] 표준 혈액 유니트로부터 수득하고, 세포 혼탁액의 최종 용적을 곱한 최종 농도로 계산된, 백혈구 세포 (백혈구)의 총량을 전혈의 각 배치에 대해 측정한다. 본 발명의 방법에 따라서 가공한 111개 배치의 전혈, 및 Danon에 개시된 공정에 따라서 가공한 4개의 배치에 대해 평균한 결과를 표 4에 기재하였다.

표 4

혈액 유니트 당 WBC의 수율 - (본 발명에서는 WBCs의 양이 대략 90배 더 높았다)

	WBC ($\times 10^6$)	
배치의 수	평균	표준 편차
본 발명 (n=111)	449	220
Danon (n=4)	5	4

[0077] 상기 결과는 Danon의 방법과 비교하여, 본 발명의 방법이 표준 혈액 유니트 (약 450 ml)로부터 수득한 백혈구의 총수가 약 90배 더 높았다. 더욱 일반적으로, 본 발명의 방법으로 적어도 약 100×10^6 , 125×10^6 , 150×10^6 , 175

$\times 10^6$, 200×10^6 , 225×10^6 , 250×10^6 , 275×10^6 , 300×10^6 , 325×10^6 , 350×10^6 , 375×10^6 , 400×10^6 , 425×10^6 , 450×10^6 , 475×10^6 , 500×10^6 , 또는 표준 혈액 유니트 당 더 높은 개수의 백혈구 (이들의 모든 서브-범위를 포함)가 생산되었다.

[0078] 퍼센트로 표시되는, 전체 세포 집단내에 포함된 생존 세포의 수는 Trypan Blue 배제법으로 측정하였다. 세포는 세포 계수와 생존률 퍼센트의 평가를 위하여 Trypan Blue에 혼탁시킨 후 (1:1 비율) Newbauer 혈구계수기에서 계수하였다. 결과를 표 5에 제시하였다.

표 5

방법	생존력 (% 생세포)	
	평균	표준 편자
본 발명 (n=111)	98 %	0.02 %
Danon (n=4)	77 %	6 %

[0080] 표 5의 데이터는 더 낮은 수율 외에 (표 4에 나타낸 바와 같이), Danon의 방법으로 생존률이 확실하게 더 낮은 세포 혼탁액이 생성됨을 나타낸다. 즉, 상기 제제의 대략 $\frac{1}{4}$ (즉, 23%)은 죽은 백혈구가 차지하였다 (죽은 세포의 퍼센트가 10 배 이상 더 높았다). 명확한 대조로, 본 발명에 따라서 가공된 백혈구 세포는 거의 모두 생존하는 것으로 측정되었다. 더욱 일반적으로, 본 발명의 ALC는 ALC 중 백혈구 세포의 총수를 기준으로 하여, 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 이상이 생존 백혈구를 함유할 수 있다 (이들의 모든 서브-범위를 포함).

[0081] 과립구 상 CD11b 활성화 마커의 발현은 유세포분석기로 측정하며, 과립구 집단 중 CD11b 양성 세포 (CD15 양성 세포)의 퍼센트로 나타낸다. 최종 생성물로부터 샘플링한 세포를 형광 이소티오시네이트 (FITC)에 접합된 항-CD11b 및 피코에리트린 (PE)에 접합된 항-CD15로 동시에 착색시키고, FACSCalibur 유세포분석기를 사용하여 분석한다 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). 81개의 최종 생성물 배치로부터의 혈액 중 과립구상에서의 CD11b 발현을 본 발명의 방법에 따라서 수행하고, 3개의 최종 생성물 배치로부터의 발현은 Danon의 방법에 따라서 수행하여, 분석한다.

표 6

과립구상에서의 CD11b 발현

방법	CD11b 활성화 마커를 발현하는 과립구의 %	
	평균	표준 편자
본 발명 (n=81)	84.6	6.2
Danon (n=3)	46.9	9.2

[0083] 표 6에 포함된 데이터에 의해 밝혀진 바와 같이, 본 발명의 방법에서는 Danon의 방법과 비교하여 퍼센트 기준으로 활성화된 과립구가 거의 2배 이상 더 높았다. 더욱 일반적으로, 본 발명의 ALCs는 ALC 중 전체 과립구 집단에 대해, 적어도 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 또는 그 이상의 CD11b (+) 과립구를 함유할 수 있다 (이들의 모든 서브-범위 포함).

[0084] 비교 실험의 결과는 여기 개시된 발명으로 Danon에 개시된 방법과 비교하여, CD11b 활성화 마커의 더 높은 발현으로 나타낸 바와 같이, 적어도 3개의 놀라운 결과, 즉, 생존 백혈구의 더 높은 수율, 생존 세포의 높은 퍼센트, 및 과립구 활성화의 더 높은 수준을 성취할 수 있음이 증명된다. 이를 증가는 급격하며 기대하지 못했던 것이다.

[0085] 본 출원에서 인용된 공보의 목록

J. Li, et al., Pathophysiology of Acute Wound Healing. Clinical Dermatol. 2007 Jan-Feb; 25(1):9-18.

G. Broughton 2nd, et al., Wound Healing:An Overview. Plast Reconstr Surg. 2006 Jun; 117(7 Suppl):1e-S-

32e-S.

- [0088] AK Tsirogianni, et al., Wound Healing:Immunological Aspects. *Injury*. 2006 Apr; 37 Suppl 1:S5-12. Epub 2006
- [0089] AJ Singer, et al., Cutaneous Wound Healing. *New Eng. J. Med.* 1999; 341 (10):738-46.
- [0090] P. Martin, Wound Healing-Aiming For Perfect Skin Regeneration. *Science* 1997; 276 (5309):75-81.
- [0091] AD Agaiby, et al., Immuno-Inflammatory Cell Dynamics During Cutaneous Wound Healing. *J. Anat.* 1999 Nov; 195 (Pt 4):531-42.
- [0092] DWH Riches, Macrophage Involvement In Wound Repair, Remodeling and Regeneration. In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, (1996) 1nd edn (ed. Clark RAF), pp. 95±41. New York, London:Plenum Press.
- [0093] D. Greiling, et al., Fibronectin Provides a Conduit for Fibroblast Transmigration from Collagenous Stroma into Fibrin Clot Provisional Matrix. *J. Cell. Sci.* 1997; 110:861-70
- [0094] MG Tonnesen, et al., Angiogenesis In Wound Healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2000; 5(1):40-6.
- [0095] JP Kim, et al., Mechanisms of Human Keratinocyte Migration on Fibronectin:Unique Role of RGD Site and Integrins. *J. Cell. Physiol.* 1992; 151:443-50.
- [0096] JJ Tomasek et al., Myofibroblasts and Mechano- Regulation of Connective Tissue Remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* (2002) 3:349-363
- [0097] S Werner, et al., Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev.* 2003 Jul; 83 (3):835-70.
- [0098] D. A. Keen, Review of Research Examining the Regulatory Role of Lymphocytes in Normal Wound Healing. *J. Wound Care.* 2008
- [0099] J Jameson, et al., A Role for Skin - T Cells in Wound Repair. *Science* 296:747-749, 1992.
- [0100] WL Havran, et al., Epithelial Cells and Their Neighbors. III. Interactions Between Intraepithelial Lymphocytes and Neighboring Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Oct; 289 (4):G627-30
- [0101] J Parkin, et al., An Overview of the Immune System. *Lancet.* 2001; 357:1777-1789
- [0102] A Moretta, et al., Human NK Cells:From HLA Class I- Specific Killer Ig-like Receptors to the Therapy of Acute Leukemias. *Immunol. Rev.* 2008 Aug; 224:58-69.
- [0103] BM Doshi, et al., Wound Healing From a Cellular Stress Response Perspective. *Cell Stress Chaperones.* 2008 Dec; 13 (4):393-9.
- [0104] GJ Moran, et al., Antimicrobial Prophylaxis for Wounds and Procedures in the Emergency Department. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2008.
- [0105] MA Fonder, et al., Treating the Chronic Wound:A Practical Approach to the Care of Nonhealing Wounds and Wound Care Dressings. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008 Feb; 58(2):185- 206.
- [0106] JA Thackham, et al., The Use of Hyperbaric Oxygen Therapy to Treat Chronic Wounds:A Review. *Wound Repair Regen.* 2008, 1998 May-Jun;16 (3):321-30
- [0107] DR Berlowitz, et al., Are all pressure ulcers the result of deep tissue injury? A Review of the Literature. *Ostomy Wound Manage.* 2007 Oct; 53(10):34-8.
- [0108] K. Girouard, et al., The symptom of pain with pressure ulcers:a review of the literature. *Ostomy Wound Manage.* 2008 May; 54(5):30-40, 32.

[0109]

특허 공보 및 비-특허 공보 둘 다를 포함하여, 본 명세서에서 인용된 모든 공보는 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가의 기술 수준의 지표이다. 이들 공보는 본 발명에서 모두 각각의 공보가 상세하고 개별적으로 참고문헌으로 인용되는 것으로 표시되는 경우와 동일한 정도로 참고로 인용된다.

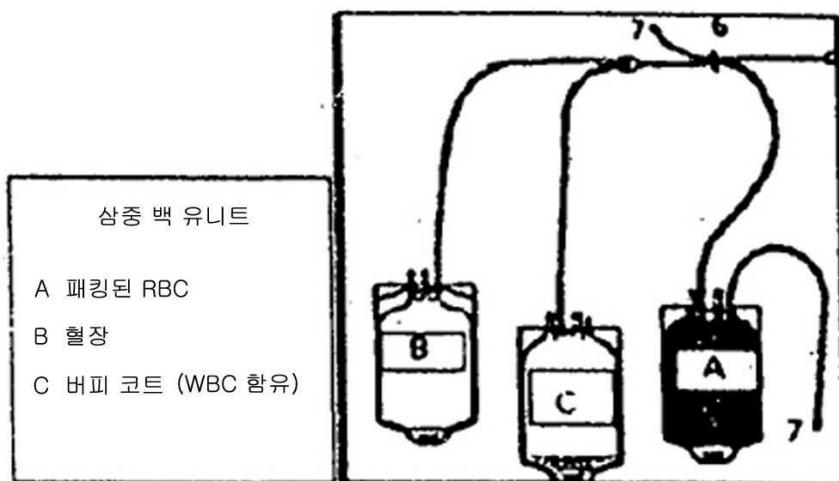
[0110]

명세서에서 본 발명이 특정 구현예들을 참고로 하여 설명되었지만, 이들 구현예는 단지 본 발명의 원리와 적용을 설명하기 위한 것임을 알아야 한다. 따라서, 예시적인 구현예에 대해 수많은 변형이 이루어질 수 있으며 첨부되는 특허 청구의 범위에 의해 정의되는 바와 같은 본 발명의 정신 및 범주로부터 벗어나지 않고 달리 배열될 수 있음을 알아야 한다.

도면

도면1

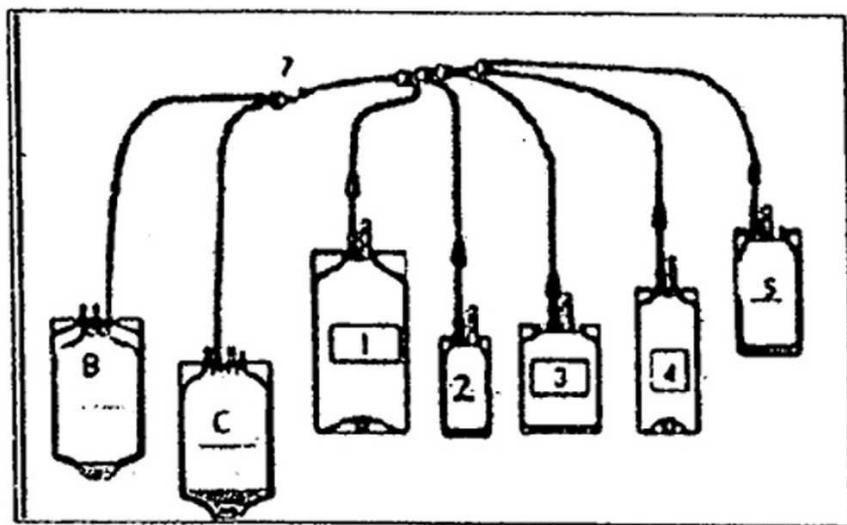
세트 1



↓ 멀균 연결 장치

도면2

세트 2

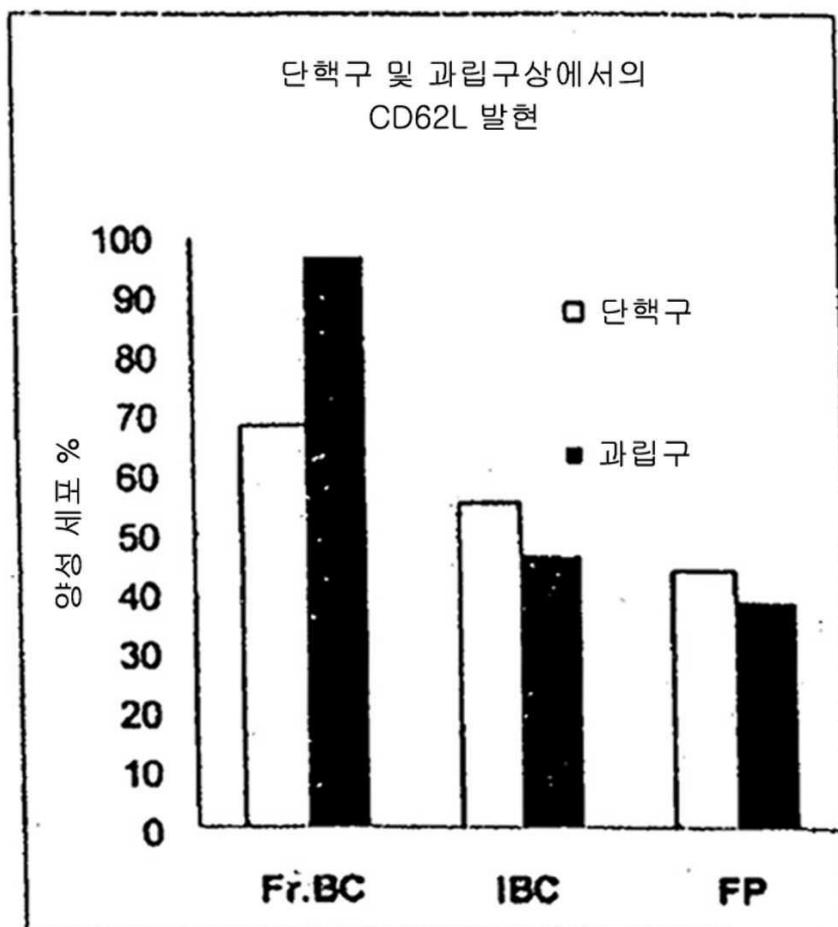


백 1: 희석용 물 (저상투압 쇼크), 200 ml; 백 2: 완충된 염화나트륨, 20 ml

백 3: 완충된 염화칼슘, 60 ml; 백 4: 공기, 60 ml; 백 5: 공기, 30 ml

도면3a

CD62L 발현



도면3b

CD42b 발현

