(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0018677
(43) 공개일자 2019년02월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 35/15* (2014.01)
A61K 35/28 (2015.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) *A61K 47/02* (2006.01)
A61K 47/20 (2017.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 47/42 (2017.01) *A61P 19/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7000781
(22) 출원일자(국제) 2017년06월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년01월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/037055
(87) 국제공개번호 WO 2017/218427
국제공개일자 2017년12월21일
(30) 우선권주장
62/349,633 2016년06월13일 미국(US)
15/619,467 2017년06월10일 미국(US)

(71) 출원인
스마트 서지컬, 인크.
미국 83705 아이다호주 보이시 웨스트 엘더 스트리트 3501
(72) 발명자
존스, 크리스토퍼 디.
미국 83616 아이다호주 이글 엔. 에스탄시아 1856
퀸타나, 네이션
미국 83709 아이다호주 보이시 더블유. 푸리탄 드라이브 11749
파텔, 로산
미국 94015 캘리포니아주 데일리 시티 벨헤븐 코트 85
(74) 대리인
양영준, 이상남

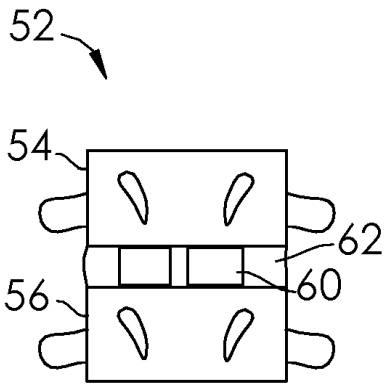
전체 청구항 수 : 총 216 항

(54) 발명의 명칭 **생물학적 시스템용 조성물 및 그의 제조 및 사용 방법**

(57) 요 약

생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물은 제1 부피를 갖고 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 알부민을 보유하고 용액 중 알부민의 농도가 약 10 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 용액을 포함한다.

대 표 도 - 도26c



(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 38/1875 (2013.01)
A61K 38/19 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/20 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61P 19/00 (2018.01)
C12N 5/0037 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 부피를 갖고; 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 알부민을 포함하는 용액이며, 여기서 용액 중 알부민의 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 용액

을 포함하는, 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 조성물의 pH가 5.0 내지 7.4인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 조성물의 pH가 4.1 내지 7.2인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 조성물의 pH가 4.1 내지 6.2인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 조성물의 pH가 5.0 내지 6.2인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 조성물의 pH를 변형시키도록 구성된 염기를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 소듐 비카르보네이트를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 칼슘 비카르보네이트를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 알부민이 상업적으로 입수가능한 인간 혈청으로부터의 것인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 알부민이 공여자-유래 혈청으로부터의 것인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 알부민이 인간 제대혈로부터의 것인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 10 mg/ml 내지 약 120 mg/ml인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 50 mg/ml 내지 약 120 mg/ml인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 105 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 함유하지 않는 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 덱스트란을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 크리요골드(CryoGold))™ 또는 등가물을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 줄기 세포가 비-확장 세포 군집으로 이루어진 것인 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제20항에 있어서, 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 살아있는 단핵 세포를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, ml 당 약 100,000개 내지 약 7천 5백만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, ml 당 약 750,000개 내지 약 3천만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서, ml 당 약 1천만개 내지 약 3천만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 28

제24항에 있어서, ml 당 약 1천만개 내지 약 2천만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 29

제24항에 있어서, ml 당 약 2백 5십만개 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 30

제24항에 있어서, ml 당 약 9백 8십만개 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 31

제24항에 있어서, 단핵 세포가 단일 공여자의 제대혈로부터만 유래되는 것인 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 시토카인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 1종 이상의 시토카인이 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β) 및 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12) 및 인터류킨 13 (IL-13)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 35

제32항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 성장 인자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 1종 이상의 성장 인자가 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2)를 포함한 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 37

제32항에 있어서, 알부민이 제1 공여자의 제대혈로부터 유래되며, 1종 이상의 생물활성 작용제가 적어도 하나의 제2 공여자로부터 유래되는 것인 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 채취되거나 유래되는 것인 조성물.

청구항 39

제32항에 있어서, 알부민 및 1종 이상의 생물활성 작용제가 단일 공여자의 제대혈로부터 유래되는 것인 조성물.

청구항 40

제32항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β), 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10), 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31), 인터페론 알파 (INFα), 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뇌-유래

신경영양 인자 (BDNF), 에오탁신, CXC 리간드 1 (GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNFβ)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 41

제1 부피를 갖고 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 알부민을 포함하는 용액이며 여기서 용액 중 알부민의 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 용액을 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 및

대상체의 조직 내에, 부근에, 또는 그에 인접하여 유효량의 조성물을 이식하는 단계

를 포함하는, 대상체에서 요법을 수행하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 이식하는 단계가 유합될 인접 추골들 사이에 조성물을 이식하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 조성물이 하중-지지 장치와 조합하여 이식되는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 하중-지지 장치가 유합 케이지를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 하중-지지 장치가 적어도 2개의 페디클 스크류 및 적어도 1개의 막대를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 대상체가 골격 성숙한 것인 방법.

청구항 47

제41항에 있어서, 이식하는 단계가 유합될 인접 골 부분들 사이에 조성물을 이식하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 인접 골 부분들이 제1 골 부분 및 제2 골 부분을 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 제1 골 부분이 제2 골 부분과 다른 대상체 골격계 중 골로부터의 것인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 제1 골 부분이 제2 골 부분과 동일한 대상체 골격계 중 골로부터의 것인 방법.

청구항 51

제47항에 있어서, 조성물이 하중-지지 장치와 조합하여 이식되는 것인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 하중-지지 장치가 판, 막대, 네일, 스크류, 후크 및 핀으로 이루어진 목록으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 53

제47항에 있어서, 대상체가 골격 성숙한 것인 방법.

청구항 54

제41항에 있어서, 이식하는 단계가 연조직 내에, 부근에, 또는 그에 인접하여 조성물을 이식하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 이식하는 단계가 암 세포에 인접하여 조성물을 이식하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 암 세포가 림프 암과 연관된 것인 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 이식하는 단계가 암 세포의 이전 부위에, 그 부근에, 또는 그에 인접하여 조성물을 이식하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 암 세포가 림프 암과 연관된 것인 방법.

청구항 59

제41항에 있어서, 조성물의 pH가 4.1 내지 7.4인 방법.

청구항 60

제41항에 있어서, 조성물이 조성물의 pH를 변형시키도록 구성된 염기를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 크리요골드™ 또는 등가물을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 덱스트란을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 줄기 세포를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 살아있는 단핵 세포를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 조성물이 ml 당 약 100,000개 내지 약 7천 5백만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 1종 이상의 생물활성 작용제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 시토카인을 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제67항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 성장 인자를 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제67항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β), 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10), 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31), 인터페론 알파 (INFα), 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 에오탁신, CXC 리간드 1 (GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNFβ)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 71

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 함유하지 않는 것인 방법.

청구항 72

제41항에 있어서, 조성물의 pH가 5.0 내지 7.4인 방법.

청구항 73

제41항에 있어서, 조성물의 pH가 4.1 내지 7.2인 방법.

청구항 74

제41항에 있어서, 조성물의 pH가 4.1 내지 6.2인 방법.

청구항 75

제41항에 있어서, 조성물의 pH가 5.0 내지 6.2인 방법.

청구항 76

제60항에 있어서, 염기가 소듐 비카르보네이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제60항에 있어서, 염기가 칼슘 비카르보네이트를 포함하는 것인 방법.

청구항 78

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민이 상업적으로 입수가능한 인간 혈청으로부터의 것인 방법.

청구항 79

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민이 공여자-유래 혈청으로부터의 것인 방법.

청구항 80

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민이 인간 제대혈로부터의 것인 방법.

청구항 81

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 80 mg/ml 내지 약 120 mg/ml인 방법.

청구항 82

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 105 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 방법.

청구항 83

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 15 mg/ml 내지 약 30 mg/ml인 방법.

청구항 84

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 18 mg/ml 내지 약 25 mg/ml인 방법.

청구항 85

제64항에 있어서, 줄기 세포가 비-확장 세포 군집으로 이루어진 것인 방법.

청구항 86

제64항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HTC)를 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제64항에 있어서, 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함하는 것인 방법.

청구항 88

제65항에 있어서, 조성물이 ml 당 약 750,000개 내지 약 3천만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 89

제65항에 있어서, 조성물이 ml 당 약 1천만개 내지 약 3천만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 90

제65항에 있어서, 조성물이 ml 당 약 1천만개 내지 약 2천만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 91

제65항에 있어서, 조성물이 ml 당 약 2백 5십만개 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 92

제65항에 있어서, 조성물이 ml 당 약 9백 8십만개 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 93

제65항에 있어서, 단핵 세포가 단일 공여자의 제대혈로부터만 유래되는 것인 방법.

청구항 94

제67항에 있어서, 알부민이 제1 공여자의 제대혈로부터 유래되며, 1종 이상의 생물활성 작용제가 적어도 하나의 제2 공여자로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 채취되거나 유래되는 것인 방법.

청구항 96

제67항에 있어서, 알부민 및 1종 이상의 생물활성 작용제가 단일 공여자의 제대혈로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 97

제1 부피를 갖고; 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 보호제를 포함하는 용액

을 포함하고, pH가 4.1 내지 7.2인, 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물.

청구항 98

제97항에 있어서, 보호제가 알부민을 포함하는 것인 조성물.

청구항 99

제97항에 있어서, 보호제가 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 100

제97항에 있어서, 보호제가 덱스트란을 포함하는 것인 조성물.

청구항 101

제97항에 있어서, 보호제가 덱스트란 및 알부민을 포함하는 것인 조성물.

청구항 102

제97항에 있어서, 보호제가 크리요골드™ 또는 등가물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 103

제97항, 제98항 및 제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 함유하지 않는 것인 조성물.

청구항 104

제97항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 보호제가 냉동보호제 특성을 갖는 것인 조성물.

청구항 105

제97항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 보호제가 단백질 보호제 특성을 갖는 것인 조성물.

청구항 106

제97항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 보호제 및 덱스트로스가 조합하여 단백질 보호제 특성을 갖는 것인 조성물.

청구항 107

제106항에 있어서, 보호제 및 덱스트로스가 조합하여 냉동보호제 특성을 갖는 것인 조성물.

청구항 108

제98항 또는 제101항에 있어서, 알부민이 상업적으로 입수가능한 인간 혈청으로부터의 것인 조성물.

청구항 109

제98항 또는 제101항에 있어서, 알부민이 공여자-유래 혈청 또는 인간 제대혈로부터의 것인 조성물.

청구항 110

제98항, 제108항 및 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 10 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 조성물.

청구항 111

제110항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 80 mg/ml 내지 약 120 mg/ml인 조성물.

청구항 112

제110항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 105 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 조성물.

청구항 113

제110항에 있어서, 용액 중 알부민의 농도가 약 15 mg/ml 내지 약 30 mg/ml인 조성물.

청구항 114

제97항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 pH가 4.1 내지 6.2인 조성물.

청구항 115

제97항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 pH가 5.0 내지 7.2인 조성물.

청구항 116

제97항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 117

제116항에 있어서, 줄기 세포가 비-확장 세포 군집으로 이루어진 것인 조성물.

청구항 118

제116항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 119

제116항에 있어서, 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 120

제97항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 121

제120항에 있어서, ml 당 약 2백 5십만개 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 122

제120항에 있어서, ml 당 약 9백 8십만개 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함하는 조성물.

청구항 123

제97항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 124

제123항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 시토카인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 125

제124항에 있어서, 1종 이상의 시토카인이 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β) 및 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-

8), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12) 및 인터류킨 13 (IL-13)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 126

제123항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 성장 인자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 127

제126항에 있어서, 1종 이상의 성장 인자가 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2)를 포함한 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 128

제123항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민이 제1 공여자의 제대혈로부터 유래되며, 1종 이상의 생물활성 작용제가 적어도 하나의 제2 공여자로부터 유래되는 것인 조성물.

청구항 129

제128항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 채취되거나 유래되는 것인 조성물.

청구항 130

제123항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민 및 1종 이상의 생물활성 작용제가 단일 공여자의 제대혈로부터 유래되는 것인 조성물.

청구항 131

제120항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵 세포가 단일 공여자의 제대혈로부터만 유래되는 것인 조성물.

청구항 132

제97항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 LMD (덱스트란 40) 또는 등가의 화합물을 포함하는 것인 조성물.

청구항 133

제97항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 저pH 액체 기제가 LMD (덱스트란 40)로 이루어진 것인 조성물.

청구항 134

제116항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포 중 생존가능 세포의 백분율이 70 % 초과인 조성물.

청구항 135

제116항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포 중 생존가능 세포의 백분율이 85 % 초과인 조성물.

청구항 136

제116항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포 중 생존가능 세포의 백분율이 95 % 초과인 조성물.

청구항 137

인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계;

인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 조합하며, 이에 따라 상청액이 형성되는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.75인 단계;

용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 상청액 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 상청액 중 적어도 일부가 부피 V_S를 갖고, 시약의 층이 부피 V_R을 갖고, 여기서 시약 층의 부피 V_R은 상청액 중 적어도 일부의 부피 V_S의 적어도 67 %인 단계;

힘 벡터가 용기의 폐쇄된 단부 방향으로 향하도록 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계;

단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액 또는 등가물과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계;

단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계; 및

조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계

를 포함하는, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 100,000개 내지 7천 5백만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 139

제137항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 750,000개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 140

제137항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 141

제137항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 2천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 142

제137항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 측정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 143

제142항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 4.1 내지 8.5가 되도록 조정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 144

제137항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 층상화 단계에서의 시약 층의 부피 V_R이 상청액 중 적어도 일부의 부피 V_S의 적어도 75 %인 방법.

청구항 145

제137항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 층상화 단계에서의 시약 층의 부피 V_R이 상청액 중 적어도 일부의 부피 V_S의 적어도 85 %인 방법.

청구항 146

제137항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 조합하는 단계에서의 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.75 내지 약 1.25인 방법.

청구항 147

제137항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 조합하는 단계에서의 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.60 내지 약 1.10인 방법.

청구항 148

제137항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 조합하는 단계에서의 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 1.25 내지 약 1.75인 방법.

청구항 149

인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계;

제1 유연성 용기 내에서 인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 혼합하는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.75인 단계;

상청액이 형성될 때까지, 혼합물을 제1 유연성 용기 내에서 적어도 20분 동안 유지시키는 단계;

제1 유연성 용기를 제2 유연성 용기에 연결하는 도관을 통하여 상청액 중 적어도 일부를 제1 유연성 용기로부터 제2 유연성 용기로 밀어내는 단계;

제2 유연성 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계;

단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 시약과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계;

단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계; 및

조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계

를 포함하는, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 150

제149항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 100,000개 내지 7천 5백만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 151

제149항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 750,000개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 152

제149항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 153

제149항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 2천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 154

제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 측정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 155

제154항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 4.1 내지 8.5가 되도록 조정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 156

제155항에 있어서, pH가 4.1 내지 7.2인 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, pH가 5.0 내지 6.2인 방법.

청구항 158

제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 혼합하는 단계에서의 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.75 내지 약 1.25인 방법.

청구항 159

제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 혼합하는 단계에서의 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.60 내지 약 1.10인 방법.

청구항 160

제149항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플을 혼합하는 단계에서의 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 1.25 내지 약 1.75인 방법.

청구항 161

인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계;

인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 조합하며, 이에 따라 상청액이 형성되는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25인 단계;

용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 상청액 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 상청액 중 적어도 일부가 컬럼 높이 CH_S를 갖고, 시약의 층이 컬럼 높이 CH_R을 갖고, 여기서 컬럼 높이 CH_R은 상청액 중 적어도 일부의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 75 %인 단계;

힘 벡터가 용기의 폐쇄된 단부 방향으로 향하도록 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계;

단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액 또는 등가물과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계;

단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계; 및

조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계

를 포함하는, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 162

제161항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 100,000개 내지 7천 5백만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 163

제161항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 750,000개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 164

제161항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 165

제161항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 2천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 166

제161항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 측정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 167

제166항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 4.1 내지 8.5가 되도록 조정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 168

인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계;

인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 조합하며, 이에 따라 상청액이 형성되는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25인 단계;

용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 상청액 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 상청액 중 적어도 일부가 컬럼 높이 CH_S를 갖고, 시약의 층이 컬럼 높이 CH_R을 갖고, 여기서 컬럼 높이 CH_R은 상청액 중 적어도 일부의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 75 %인 단계;

힘 벡터가 용기의 폐쇄된 단부 방향으로 향하도록 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계;

단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액 또는 등가물과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계; 및

단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계

를 포함하는, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 100,000개 내지 7천 5백만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 170

제168항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 750,000개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 171

제168항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 3천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 172

제168항에 있어서, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 부피 V_D의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 첨가하여, ml 당 살아있는 단핵 세포 1천만개 내지 2천만개의 농도를 갖는 조정된 조성물을 생성시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 부피 V_D는 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 총 수 N_L을 기반으로 하는 것인 방법.

청구항 173

제168항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 측정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 174

제173항에 있어서, 조정된 조성물의 pH를 4.1 내지 8.5가 되도록 조정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 175

제168항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 176

인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_1을 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계;

적혈구의 적어도 약 95 %를 샘플로부터 제거하고 실질적인 양의 비-세포성 물질을 샘플로부터 제거하여, 샘플로부터 생성되는 펠렛이 적혈구가 아닌 다른 세포를 실질적으로 포함하도록 하는 단계이며, 생성되는 펠렛이 제2 부피 V_2를 갖는 것인 단계;

생성된 펠렛의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액으로 희석하는 것에 의해 생성된 펠렛의 적어도 일부를 재구성하는 단계이며, 적어도 일부가 최초 부피 V_i를 갖고, 생성되는 희석된 부분이 희석된 부피 V_{dil}을 갖고, 이에

따라 희석된 부피와 최초 부피 사이의 비 V_{dil}/V_i가 약 0.95 × V_1/V_2 내지 약 1.05 × V_1/V_2인 단계;

용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 생성되는 희석된 부분 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 생성되는 희석된 부분 중 일부가 부피 V_3을 갖고, 시약의 층이 부피 V_4를 갖고, 여기서 시약 층의 부피 V_4는 생성되는 희석된 부분 중 일부의 부피 V_3의 약 15 % 내지 약 85 %인 단계;

힘 벡터가 시약 층을 포함하는 용기의 단부 방향으로 향하도록 용기에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계;

단핵 세포 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계;

단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 수 N_L을 추정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_5를 갖는 것인 단계;

부피 V_6의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 첨가하는 단계이며, 부피 V_6이 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서의 살아있는 세포의 수 N_L에 따라 달라지는 것인 단계;

덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란과 단핵 세포 용액의 조합된 조성물의 pH를 필요할 경우 4.1 내지 8.5가 되도록 조정하는 단계; 및

조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계

를 포함하는, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법.

청구항 177

제137항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵 세포 용액이 줄기 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 178

제177항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함하는 것인 방법.

청구항 179

제177항에 있어서, 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함하는 것인 방법.

청구항 180

제137항, 제149항, 제161항 및 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민을 첨가한 후 조합된 조성물을 극저온으로 저장하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 세포 수는 ml 당 약 2백 5십만개의 살아있는 단핵 세포 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포로 감소되는 것인 방법.

청구항 181

제180항에 있어서, 세포 수가 ml 당 약 9백 8십만개의 살아있는 단핵 세포 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포로 감소되는 것인 방법.

청구항 182

제138항 내지 제141항, 제150항 내지 제153항, 제162항 내지 제165항, 제169항 내지 제172항 및 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란이 LMD (덱스트란 40)를 포함하는 것인 방법.

청구항 183

제143항, 제155항, 제167항, 제174항 및 제176항 중 어느 한 항에 있어서, pH를 조정하는 단계 후, pH가 4.1 내지 7.2인 방법.

청구항 184

제183항에 있어서, pH를 조정하는 단계 후, pH가 4.1 내지 6.2인 방법.

청구항 185

제143항, 제155항, 제167항, 제174항, 제176항, 제183항 및 제184항 중 어느 한 항에 있어서, pH를 조정하는 단계가 소듐 비카르보네이트 분말을 첨가하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 186

제137항, 제149항, 제161항 및 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 알부민을 첨가하는 단계가 조합된 조성물 ml 당 약 10 mg 내지 약 150 mg의 알부민을 첨가하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 187

제186항에 있어서, 알부민을 첨가하는 단계가 조합된 조성물 ml 당 약 15 mg 내지 약 30 mg의 알부민을 첨가하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 188

제186항에 있어서, 알부민을 첨가하는 단계가 조합된 조성물 ml 당 약 80 mg 내지 약 150 mg의 알부민을 첨가하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 189

제137항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 디메틸 술폭시드 (DMSO)가 조성물에 첨가되지 않는 것인 방법.

청구항 190

제137항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제를 첨가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 시토카인을 포함하는 것인 방법.

청구항 192

제190항 또는 제191항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 1종 이상의 성장 인자를 포함하는 것인 방법.

청구항 193

제190항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 인간 제대혈을 포함하는 샘플로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 194

제190항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 인간 제대혈을 포함하는 샘플로부터의 것이 아닌 인간 제대혈로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 195

제190항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 생물활성 작용제가 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 채취되거나 유래되는 것인 방법.

청구항 196

제176항에 있어서, 제거 단계가 적혈구 중 적어도 약 98 %를 샘플로부터 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 197

제196항에 있어서, 제거 단계가 적혈구 중 적어도 약 99 %를 샘플로부터 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 198

제176항, 제196항 및 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 제거 단계가 비-세포성 물질 중 적어도 약 95 부피%를 샘플로부터 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 199

제137항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 인가 단계가 원심분리기를 사용하여 회전시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 200

제137항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 인가 단계가 해수면에서의 중력 가속도의 적어도 약 350배를 내용물에 인가하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 201

제137항 내지 제148항 및 제161항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약이 피콜-패크 프리미엄(Ficoll-Paque PREMIUM) 원심분리 매질을 포함하는 것인 방법.

청구항 202

제176항에 있어서, 추정 단계가 CD34+ 계수를 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 203

제176항에 있어서, 추정 단계가 총 유핵 세포 (TNC) 계수를 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 204

제176항에 있어서, 부피 V_6을 첨가하는 단계에서, ml로 나타낸 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 부피 V_6이 식 $V_6 = K \times N_L$에 부합하며, 여기서 K는 약 7.35×10^{-8} ml/세포 내지 약 3.00×10^{-7} ml/세포이고, N_L은 단핵 세포 용액의 20 ml 부분 중 살아있는 세포의 수인 방법.

청구항 205

제204항에 있어서, 부피 V_6을 첨가하는 단계에서, ml로 나타낸 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 부피 V_6이 식 $V_6 = K \times N_L$에 부합하며, 여기서 K는 약 7.35×10^{-8} ml/세포 내지 약 7.50×10^{-8} ml/세포이고, N_L은 단핵 세포 용액의 20 ml 부분 중 살아있는 세포의 수인 방법.

청구항 206

제176항에 있어서, 제거 단계가 인간 제대혈을 프레파사이트-CB 용액 또는 등가물과 조합하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 207

제176항 또는 제206항에 있어서, 제거 단계가 인간 제대혈을 원심분리기 내 용기에 위치시키고 원심분리기를 작동시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 208

제176항에 있어서, 조합 단계가 단핵 세포를 락테이트화된 링거 용액과 혼합하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 209

제137항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵 세포 용액이 비-확장 세포 군집을 실질적으로 포함하는 것인 방법.

청구항 210

제137항 내지 제179항 및 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵 세포 용액이 비-혼합수집 세포 군집을 실질적으로 포함하는 것인 방법.

청구항 211

제176항에 있어서, 시약 층의 부피 V_4가 생성되는 희석된 부분 중 일부의 부피 V_3의 약 45 % 내지 약 55 %인 방법.

청구항 212

제176항에 있어서, 시약 층의 부피 V_4가 생성되는 희석된 부분 중 일부의 부피 V_3의 약 75 % 내지 약 85 %인 방법.

청구항 213

제176항에 있어서, 시약 층의 부피 V_4가 생성되는 희석된 부분 중 일부의 부피 V_3의 약 50 %인 방법.

청구항 214

제176항에 있어서, 추정 단계 후 실질적으로 모든 락테이트화된 링거 용액을 제거하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 215

제176항에 있어서, 조합 단계 후 단핵 세포 용액 중 단핵 세포를 세척하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 216

제215항에 있어서, 단핵 세포를 세척하는 것이 적어도 2회 단핵 세포를 세척하는 것을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 분야는 대체적으로 골 재발생을 포함한 조직 재발생을 위한 세포성 동종이식물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포성 동종이식물 조성물의 공급원은 역사적으로는 성인 골수와 연관되어 있었지만, 최근에는 태반액이 실험적 공급원이 되어 왔다.

발명의 내용

[0003] 한 실시양태에서, 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물은 제1 부피를 갖고 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 알부민을 포함하는 용액이며 여기서 용액 중 알부민의 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 용액을 포함한다.

[0004] 또 다른 실시양태에서, 대상체에서 요법을 수행하는 방법은 제1 부피를 갖고 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 알부민을 포함하는 용액이며 여기서 용액 중 알부민의 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 150 mg/ml인 용액을 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체의 조직 내에, 부근에, 또는 그에 인접하여 유효량의 조성물을 이식하는 단계를 포함한다.

[0005] 또 다른 실시양태에서, 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물은 제1 부피를 갖고 덱스트로스를 포함하는 저pH 액체 기제 및 보호제를 포함하는 용액을 포함하고, 조성물의 pH는 4.1 내지 7.2이다.

[0006] 또 다른 실시양태에서, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법은 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다

른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계, 인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트(PrepaCyte)-CB 또는 등가물과 조합하며, 이에 따라 상청액이 형성되는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.75인 단계, 용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 상청액 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 상청액 중 적어도 일부가 부피 V_S를 갖고, 시약의 층이 부피 V_R을 갖고, 여기서 시약 층의 부피 V_R은 상청액 중 적어도 일부의 부피 V_S의 적어도 67 %인 단계, 힘 벡터가 용기의 폐쇄된 단부 방향으로 향하도록 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액 또는 등가물과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계, 및 조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계를 포함한다.

[0007] 또 다른 실시양태에서, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법은 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계, 제1 유연성 용기 내에서 인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 혼합하는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.75인 단계, 상청액이 형성될 때까지, 혼합물을 제1 유연성 용기 내에서 적어도 20분 동안 유지시키는 단계, 제1 유연성 용기를 제2 유연성 용기에 연결하는 도관을 통하여 상청액 중 적어도 일부를 제1 유연성 용기로부터 제2 유연성 용기로 밀어내는 단계, 제2 유연성 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 시약과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계, 및 조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계를 포함한다.

[0008] 또 다른 실시양태에서, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법은 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계, 인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 조합하며, 이에 따라 상청액이 형성되는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25인 단계, 용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 상청액 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 상청액 중 적어도 일부가 컬럼 높이 CH_S를 갖고, 시약의 층이 컬럼 높이 CH_R을 갖고, 여기서 컬럼 높이 CH_R은 상청액 중 적어도 일부의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 75 %인 단계, 힘 벡터가 용기의 폐쇄된 단부 방향으로 향하도록 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액 또는 등가물과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것인 단계, 및 조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계를 포함한다.

[0009] 또 다른 실시양태에서, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법은 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계, 인간 제대혈을 포함하는 샘플을 부피 V_{PC}를 갖는 소정량의 프레파사이트-CB 또는 등가물과 조합하며, 이에 따라 상청액이 형성되는 단계이며, 여기서 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25인 단계, 용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 상청액 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 상청액 중 적어도 일부가 컬럼 높이 CH_S를 갖고, 시약의 층이 컬럼 높이 CH_R을 갖고, 여기서 컬럼 높이 CH_R은 상청액 중 적어도 일부의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 75 %인 단계, 힘 벡터가 용기의 폐쇄된 단부 방향으로 향하도록 용기의 내용물에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액 또는 등가물과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계, 및 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 총 수 N_L을 측정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_M을 갖는 것

인 단계를 포함한다.

[0010] 또 다른 실시양태에서, 대상체 내 이식용으로 구성되는 생물학적 성장에 영향을 주기 위한 조성물을 제조하는 방법은 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_1을 갖는 샘플이며 여기서 인간 제대혈은 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함하는 것인 샘플을 수득하는 단계, 적혈구의 적어도 약 95 %를 샘플로부터 제거하고 실질적인 양의 비-세포성 물질을 샘플로부터 제거하여, 샘플로부터 생성되는 펠렛이 적혈구가 아닌 다른 세포를 실질적으로 포함하도록 하는 단계이며, 생성되는 펠렛이 제2 부피 V_2를 갖는 것인 단계, 생성된 펠렛의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액으로 희석하는 것에 의해 생성된 펠렛의 적어도 일부를 재구성하는 단계이며, 여기서 적어도 일부가 최초 부피 V_i를 갖고, 생성되는 희석된 부분이 희석된 부피 V_{dil}을 갖고, 이에 따라 희석된 부피와 최초 부피 사이의 비 V_{dil}/V_i가 약 0.95 × V_1/V_2 내지 약 1.05 × V_1/V_2인 단계, 용기 내에서 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약의 층 상에 생성되는 희석된 부분 중 적어도 일부를 층상화하는 단계이며, 생성되는 희석된 부분 중 일부가 부피 V_3을 갖고, 시약의 층이 부피 V_4를 갖고, 여기서 시약 층의 부피 V_4는 생성되는 희석된 부분 중 일부의 부피 V_3의 약 15 % 내지 약 85 %인 단계, 힘 벡터가 시약 층을 포함하는 용기의 단부 방향으로 향하도록 용기에 충분한 원심력을 인가하여, 단핵 세포를 실질적으로 포함하는 적어도 하나의 새로운 층이 형성되도록 하는 단계, 단핵 세포 층의 적어도 일부를 락테이트화된 링거 용액과 조합하여, 단핵 세포 용액을 생성시키는 단계, 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서 살아있는 세포의 수 N_L을 추정하는 단계이며, 단핵 용액의 적어도 일부가 부피 V_5를 갖는 것인 단계, 부피 V_6의 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란을 단핵 세포 용액의 적어도 일부에 첨가하는 단계이며, 부피 V_6이 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부에서의 살아있는 세포의 수 N_L에 따라 달라지는 것인 단계, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란과 단핵 세포 용액의 조합된 조성물의 pH를 필요할 경우 4.1 내지 8.5가 되도록 조정하는 단계, 및 조합된 조성물에 알부민을 첨가하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 제1 실시양태에 따른 환자 내 이식용 조성물의 형성 방법을 도시한다.

도 2는 제1 및 제2 층이 위치되어 있는 용기를 도시한다.

도 3은 용기에 원심력을 적용하기 위한 일반적인 기작을 도시한다.

도 4는 원심력 적용 후의 도 2의 용기를 도시한다.

도 5는 특정 물질 제거 후의 도 4의 용기를 도시한다.

도 6은 제2 실시양태에 따른 환자 내 이식용 조성물의 형성 방법을 도시한다.

도 7은 제1 및 제2 층이 위치되어 있는 용기를 도시한다.

도 8은 용기에 원심력을 적용하기 위한 일반적인 기작을 도시한다.

도 9는 원심력 적용 후의 도 7의 용기를 도시한다.

도 10은 특정 물질 제거 후의 도 9의 용기를 도시한다.

도 11은 제3 실시양태에 따른 환자 내 이식용 조성물의 형성 방법을 도시한다.

도 12는 작동시의 제1 및 제2 유연성 용기를 도시한다.

도 13은 도 12의 제2 유연성 용기에 원심력을 적용하기 위한 일반적인 기작을 도시한다.

도 14는 또 다른 작동시의 도 12의 제1 및 제2 유연성 용기를 도시한다.

도 15는 원심력 적용 후의 제2 유연성 용기를 도시한다.

도 16은 제4 실시양태에 따른 환자 내 이식용 조성물의 형성 방법을 도시한다.

도 17은 제1 및 제2 층이 위치되어 있는 용기를 도시한다.

도 18은 용기에 원심력을 적용하기 위한 일반적인 기작을 도시한다.

도 19는 원심력 적용 후의 도 17의 용기를 도시한다.

도 20은 특정 물질 제거 후의 도 19의 용기를 도시한다.

도 21은 제5 실시양태에 따른 환자 내 이식용 조성물의 형성 방법을 도시한다.

도 22는 제1 및 제2 층이 위치되어 있는 용기를 도시한다.

도 23은 용기에 원심력을 적용하기 위한 일반적인 기작을 도시한다.

도 24는 원심력 적용 후의 도 22의 용기를 도시한다.

도 25는 특정 물질 제거 후의 도 24의 용기를 도시한다.

도 26a-26c는 한 실시양태에 따른 환자에서의 척추 유합 시술시의 2개의 추골을 도시한다.

도 27a-27b는 한 실시양태에 따른 환자에서의 유합 시술시의 2개의 골 부분을 도시한다.

도 28a-28b는 한 실시양태에 따른 환자에서의 시술시의 연조직을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 적어도 부분적으로 제대혈로부터 유래되는 세포성 동종이식물의 조성물은 물론, 그의 제조 및 사용에 관한 것이다. 본원에서 기술되는 교시에 따라, 생물학적 과정을 촉진 또는 최적화하거나 새로운 생물학적 과정을 개시하기 위한 조성물이 제조될 수 있다. 유리하게도, 세포 및 성장 인자들이 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있는데, 본질적으로 제대혈이 범용의 공여자 적용을 지지할 수 있는 선천 세포 군집(native cell population)을 포함한다는 장점으로부터 이점을 얻을 수 있다. 본질적으로 증가되는 세포의 건강 역시 세포성 동종이식물의 이점을 유지할 수 있다.

[0013] 조성물의 일부 실시양태에서는, 알부민이 첨가된다. 본원에서 "일부 실시양태에서"의 사용은 "기술되는 요소가 첨가될 가능성 또는 가망이 있는 임의의 실시양태 또는 임의 실시양태들의 조합에서"를 의미하고자 하는 것임을 주지해야 한다. 출원인에 의해 수행된 연구에서, 알부민은 그와 같은 조성물의 가공시 흔한 냉동 및 해동 절차 동안의 혈액 중 세포 구성요소들의 생존력을 증가시키는 것으로 나타났다. 알부민은 단백질 안정화제로 작용함으로써 용액에서의 단백질의 응집을 방지함은 물론 올바르지 않은 단백질 접힘의 양을 감소시키는 것에 의해 해동-후 세포 생존력을 강화할 수 있는 것으로 여겨진다. 단백질의 올바른 접힘은 단백질이 예를 들면 그의 원하는 3-차원 구조를 달성하는 것을 가능케 한다. 그러나, 잘못 접힌 단백질은 변형되거나 독성인 기능성을 갖는다. 알부민은 배양 과정 동안 사용되는 플라스크 (배양 플라스크)에 대한 세포의 부착에 영향을 주는 것으로도 나타났다. 알부민은 또한 제대혈 세포, 예를 들면 줄기 세포의 분화 속도를 강화할 수 있다.

[0014] 소정 조성물에서는, 약 4.0 내지 약 5.0 또는 약 4.4의 pH와 같은 낮은 산성의 pH가 바람직할 수 있는데, 그와 같은 조성물은 무-세포 추출물을 포함하는 상처 케어용으로 예정된다. 저pH 조성물은 예를 들면 냉동 또는 해동 동안 세포의 사멸 및 파열을 촉진하는 미세환경을 가질 수 있다. 이와 같은 세포의 사멸 및 파열 또는 그의 증가는 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함한 가용성인 세포외 단백질 인자 또는 생물활성 작용제들의 증가를 초래할 수 있다. 이러한 생물활성 작용제들은 상처 치유의 동역학에서 잠재적으로 도움이 되는 성분인 것으로 여겨진다. 상처 치유의 동역학 또는 시간적인 측면은 환자의 조직에 첨가되는 조성물의 구체적인 구성에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 약 70 % 이하의 생존가능 세포를 포함하는 세포를 함유하는 조성물은 약 95 % 초과의 생존가능 세포를 포함하는 세포를 함유하는 조성물에 비해 더 큰 상대적 부피 또는 양의 가용성 세포외 인자/생물활성 작용제를 포함할 수 있다. 이에 따라, 약 70 % 이하의 생존가능 세포를 갖는 조성물은 약 95 % 초과의 생존가능 세포를 갖는 조성물에 비해 더 빠른 상처 치유 반응을 야기할 수 있다. 따라서, 기술되는 바와 같은 상대적으로 저-pH인 조성물의 사용은 하나 이상의 만성 상처를 가지고 있는 환자에서 이용될 수 있다.

[0015] 반면, 다른 조성물에서는, 약 7.0 내지 약 8.0 또는 약 7.5의 pH와 같은 더 알칼리성인 pH가 바람직할 수 있는데, 그와 같은 조성물은 줄기 세포와 같은 생존가능 세포를 사용하는 생물학적 치유 과정을 매개하도록 예정된다. 알부민은 세포에 대한 pH의 효과를 조절하는 것을 도울 수 있으며, 그에 따라 본 발명의 목적을 위한 것들과 같은 조성물에 도입될 수 있다.

[0016] 본 출원인은 알부민의 존재하에 배양될 경우, 제대혈 세포가 다양한 형태구조를 갖는 수종의 서로 다른 세포 유형으로 분화하는 것도 관찰하였다. 분화-후 이러한 특정 세포 종들을 식별하는 것에 의해, 각 특정 세포 군을

강화함으로써 각 경우의 특수 조성물을 생성시킬 수 있다. 예를 들면, 1종 이상의 특정 조성물이 특별히 골 치유 또는 골 성장용으로 제제화되거나, 1종 이상의 특정 조성물이 특별히 신경 치유 또는 신경 성장용으로 제제화되거나, 또는 다른 조성물이 다른 유형 조직의 치유 또는 성장용으로 제제화된다. 세포 유형의 식별 후에는, 줄기 세포의 분화가 그 특정 세포 유형쪽으로 유도될 수 있다. 각 세포 유형을 사용하여, 그 세포 유형과 연관되어 있는 특정 생물활성 작용제들 (시토카인, 성장 인자 등)이 단리될 수 있다. 이러한 생물활성 작용제들은 이후 특정 조성물에서 특화된 목적에 사용될 수 있다. 예로서, 온코스타틴(oncostatin) M은 세포외 매트릭스(ECM)에 점착하거나 결합하는 시토카인으로써, 골 및 신경 둘 다에 영향을 주는 성장 인자로 식별되어 있다. 적어도 이와 같은 이유로, 온코스타틴 M은 골 및/또는 신경 동종이식물 조성물에 도입될 수 있다. 또 다른 예로서, 골 형태형성 단백질 (BMP)은 골과 함께 사용하기 위한 동종이식물 조성물에 도입될 수 있는 성장 인자 또는 시토카인이다.

[0017] 조성물의 제1 실시양태는 제1 부피를 갖고 덱스트로스 및 덱스트란을 포함하는 저pH 액체 기제를 포함하고 또한 알부민을 포함하는 용액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 저pH 액체 기제는 LMD (덱스트란 40) 또는 등가의 화합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 저pH 액체 기제는 LMD (덱스트란 40)로 구성된다. 덱스트로스 및 덱스트란, 특히 덱스트로스 성분의 저pH 액체 기제는 예를 들면 시토카인과 같은 단백질의 응집을 방지하는 것에 의해 단백질 보호제로 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 10 mg/ml (밀리리터 당 밀리그램) 내지 약 150 mg/ml 또는 약 10 mg/ml (밀리리터 당 밀리그램) 내지 약 120 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 15 mg/ml (밀리리터 당 밀리그램) 내지 약 30 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 18 mg/ml (밀리리터 당 밀리그램) 내지 약 25 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 20 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 80 mg/ml 내지 약 150 mg/ml 또는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 80 mg/ml 내지 약 120 mg/ml 또는 약 50 mg/ml 내지 약 120 mg/ml 또는 약 90 mg/ml 내지 약 110 mg/ml의 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 용액 중 알부민은 약 105 mg/ml 내지 약 150 mg/ml 또는 약 105 mg/ml 내지 약 120 mg/ml의 농도를 갖는다. 합쳐보면, 해당 공급원 (예컨대 제대혈)으로부터 수득된 단백질의 완전성을 유지하는 것에 의해, 덱스트로스 및 덱스트란의 저pH 액체 기제와 알부민은 함께 저장제 또는 보호제 (보존제, 안정화제)로 작용한다. 덱스트로스 및 덱스트란의 저pH 액체 기제의 또 다른 유익한 용도는 그의 기준선 pH가 생리학적 pH에 비해 더 낮기 때문에 그것이 상대적으로 낮은 pH를 제공하며, 그에 따라 신호전달 단백질의 증가를 통하여 상처 치유를 촉진하는 세포들을 동원하는 환경에서의 사용을 제공한다는 것이다. 덱스트로스 및 덱스트란의 저pH 액체 기제에 분말화된 형태로 알부민이 첨가되는 실시양태에서는, 예를 들면 혈청 중에서 덱스트로스 및 덱스트란의 저pH 액체 기제와 알부민을 조합하는 것에 비해 비용 절감이 제공된다.

[0018] 필요에 따라, 조성물의 최종 pH를 조절하기 위하여, 소듐 비카르보네이트 분말과 같은 물질이 용액에 첨가될 수 있다. 대안적으로는, 칼슘 비카르보네이트 액체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 4.1 내지 7.2일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 4.1 내지 7.4, 일부 경우에는 심지어는 7.4 초과일 수도 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 4.1 내지 6.2일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 5.0 내지 7.4일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물의 pH는 5.0 내지 6.2일 수 있다. 일부 경우에서, 열거된 범위들 중 하나 내의 pH는 소듐 비카르보네이트 또는 칼슘 비카르보네이트와 같은 추가적인 염기를 첨가할 필요 없이 덱스트로스 및 덱스트란의 저pH 액체 기제의 본질적인 특징에 기반하여 달성될 수 있다. 다른 경우에서는, 열거된 범위들 중 하나 내의 pH를 달성하기 위하여 추가적인 염기가 사용될 수 있다. 소정의 경우에는, 열거된 범위들 중 하나 이내인 pH를 달성하기 위하여 추가적인 염기를 사용할 필요가 있을 수 있다.

[0019] 일부 실시양태에서, 알부민은 상업적으로 입수가능한 인간 혈청으로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 다른 실시양태에서, 알부민은 공여자-유래 혈청으로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 알부민은 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다.

[0020] 일부 실시양태에서, 조성물은 전구 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 줄기 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 예를 들면 페트리 접시 또는 성장 배지/매트릭스에서 성장에 의해 확장되지 않는 비-확장 세포 군집으로 구성된다. 제대혈 세포 군집 및 다른 인자들의 전체적인 구성은 더 광범위한 이점을 환자에게 제공할 수 있다. 줄기 세포는 비제한적으로 조혈 줄기 세포 (HSC) 또는 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함한 1종 이상 유형의 줄기 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포는 생존가능 세포 및 비-생존가능 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포 중 생존가능 세포의 백분율은 70 %를 초과할 수 있다. 일부 실시양태에서, 줄기 세포 중 생존가능 세포의 백분율은 85 %를 초과할 수 있다. 일

부 실시양태에서, 줄기 세포 중 생존가능 세포의 백분율은 95 %를 초과할 수 있다.

[0021] 일부 실시양태에서, 조성물은 비제한적으로 줄기 세포 또는 생물활성 작용제를 포함할 수 있는 살아있는 단핵 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 밀리리터 (ml) 당 약 2백 5십만개의 살아있는 단핵 세포 내지 밀리리터 (ml) 당 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 밀리리터 (ml) 당 약 9백 8십만개의 살아있는 단핵 세포 내지 밀리리터 (ml) 당 약 1천 2십만개의 살아있는 단핵 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포는 단일 공여자의 제대혈로부터 유래될 수 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 조성물은 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함한 1종 이상의 생물활성 작용제를 포함할 수 있다. 상기 생물활성 작용제에는 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β) 및 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12) 및 인터류킨 13 (IL-13)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α). 생물활성 작용제에는 또한 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2)를 포함한 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF).

[0023] 조성물에 도입될 수 있는 다른 생물활성 작용제에는 하기 중 1종 이상이 포함될 수 있다: 형질전환 성장 인자 베타 1 (TGF-β1), 형질전환 성장 인자 알파 1 (TGF-α1), 인터류킨 16 (IL-16), 혈소판 인자 4 (PF4), 인터페론 감마 (IFNγ), 간세포 성장 인자 (HGF), 인슐린 성장 인자 (IGF-1), fas 리간드 (Fas-L), 단핵구 화학유인물질 단백질 2 (MCP-2), 단핵구 화학유인물질 단백질 3 (MCP-3), 단핵구 화학유인물질 단백질 4 (MCP-4), 대식세포 유래 케모카인 (MDC), 혈소판 인자 4 (PF-4), 트롬보포이에틴 (TPO), 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 및 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질-3 (IGFBP-3).

[0024] 조성물에 도입될 수 있는 다른 생물활성 작용제에는 하기 중 1종 이상이 포함될 수 있다: 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31), 에오탁신, CXC 리간드 1 (GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNF β). 각 인터류킨 범주는 범주 또는 족에 속하는 1종 이상의 구성원을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인터류킨 17 (IL-17) 범주 내에서는, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 등과 같은 수종의 종들 중 1종이 선택될 수 있다. IL-17이 총칭하여 지칭되는 경우, 이러한 여러 종들 중 임의의 1종 이상을 포괄하고자 하는 것이다.

[0025] 일부 실시양태에서, 조성물은 알부민 및 1종 이상의 생물활성 작용제를 포함할 수 있는데, 여기서 알부민은 제1 공여자의 제대혈로부터 유래되며, 1종 이상의 생물활성 작용제는 적어도 하나의 제2 공여자로부터 유래된다. 1종 이상의 생물활성 작용제는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 및/또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 채취되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 알부민 및 1종 이상의 생물활성 작용제를 포함할 수 있으며, 여기서 알부민 및 1종 이상의 생물활성 작용제는 단일 공여자의 제대혈로부터 유래된다.

[0026] 일부 실시양태에서, 조성물은 대상체에서 알레르기 반응을 유도하는 것과 같이 DMSO가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 유해 효과를 방지하기 위하여, 그것이 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 포함하지 않도록 제조될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서는, 예를 들면 냉동보호제로서, 덱스트란 대체물로서, 또는 덱스트란과 조합하여 여전히 DMSO가 사용될 수 있다. 덱스트란 및/또는 DMSO을 대체할 수 있는 대안적인 냉동보호제 또는 냉동보존제로는, 미국 캘리포니아 팔로 알토 소재 시스템 바이오사이언시즈(System Biosciences), Inc. 사에 의해 공급되는 크리요골드(CryoGold)™가 있다. 글리세롤은 대체될 수 있는 또 다른 대안적인 냉동보호제 또는 냉동보존제이다.

[0027] 제1 실시양태에 따라, 본원에서 기술되는 실시양태들과 같은 조성물의 제조 방법을 기술한다. 도 1의 단계 (10)에서는, 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_1을 갖는 샘플이 수득된다. 인간 제대혈은 통상적으로 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함한다. 단계 (12)에서는, 적혈구 중 적어도 약 95 %가 샘플로부터 제거되며, 실질적인 양의 비-세포성 물질이 샘플로부터 제거된다. 단계 (12)는 적혈구가 아닌 다른 세

포를 실질적으로 포함하는 펠렛을 생성시킨다. 상기 펠렛은 제2 부피 V_2를 갖는다. 일부 실시양태에서는, 적혈구 중 적어도 약 98 %가 샘플로부터 제거된다. 일부 실시양태에서는, 적혈구 중 적어도 약 99 %가 샘플로부터 제거된다. 일부 실시양태에서는, 비-세포성 물질 중 적어도 약 95 % (부피 기준)가 샘플로부터 제거된다. 일부 실시양태에서, 적혈구 및/또는 비-세포성 물질의 제거는 인간 제대혈을 미네소타 블루밍턴 소재 바이오-E, LLC 사의 프레파사이트®-CB 용액, 또는 등가의 응집제 또는 침강제와 조합하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적혈구 및/또는 비-세포성 물질의 제거는 인간 제대혈을 원심분리기 내 용기에 위치시키고 원심분리기를 작동시키는 것을 포함할 수 있다. 이는 인간 제대혈을 프레파사이트-CB 용액 또는 등가의 응집제 또는 침강제와 조합한 후에 이루어질 수도 있다. 단계 (14)에서는, 펠렛의 적어도 일부가 락테이트화된 링거 용액으로 그것을 희석하는 것에 의해 재구성된다. 펠렛의 상기 적어도 일부는 최초 부피 V_i를 갖고, 생성되는 희석된 부분은 희석된 부피 V_{dil}을 갖는다. 일부 실시양태에서, 희석된 부피와 최초 부피 사이의 비 V_{dil}/V_i는 약 0.95 × V_1/V_2 내지 약 1.05 × V_1/V_2이다. 단계 (16)에서는, 원심분리기 내 배치용으로 구성된 튜브를 포함할 수 있는 용기 (30) (도 2)가 2개의 층으로 충전된다. 도 2에 나타내 바와 같이, 제1 층 (32)은 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시약은 스웨덴 웁살라 소재 GE 헬스케어 바이오-사이언시즈(Healthcare Bio-Sciences) AB 사의 피콜-패크(Ficoll-Paque)® 원심분리 매질, 또는 등가의 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약은 피콜-패크® 플러스(PLUS) 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약은 피콜-패크® 프리미엄(PREMIUM) 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약은 약 1.0 그램/ml 내지 약 1.3 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약은 약 1.07 그램/ml 내지 약 1.09 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약은 약 1.073 그램/ml 내지 약 1.084 그램/ml의 밀도를 갖는다. 제2 층 (34)은 제1 층 (32)상에 위치된다. 제2 층 (34)은 단계 (14)로부터의 생성되는 희석된 부분 중 적어도 일부를 포함한다. 제1 층 (32) 및 제2 층 (34)은 제2 층 (34)의 부피 V_3이 제1 층 (32)의 부피 V_4상에 위치됨으로써 부피 V_4가 V_3의 약 15 % 내지 약 85 %가 되도록 용기 (30) 내에 위치된다. 일부 실시양태에서, 부피 V_4는 V_3의 약 45 % 내지 약 55 %이다. 일부 실시양태에서, 부피 V_4는 V_3의 약 75 % 내지 약 85 %이다. 일부 실시양태에서, 부피 V_4는 V_3의 약 50 %이다.

[0028] 단계 (18)에서는, 원심력 성분 (48)이 폐쇄된 용기 단부 (50) 방향으로 향하도록 용기 (30) (도 3) 및 그의 내용물 (예컨대 제1 층 (32) 및 제2 층 (34))에 충분한 원심력 성분 (48)이 인가됨으로써, 도 4에 나타낸 바와 같은 층상화의 형성이 야기된다. 도 3은 중심점 (42) 주변의 원형 경로 (44)로 용기 (30)를 회전시키는 원심분리기 (46)의 기본적인 역학을 도시한다. 도 4에서, 층 (36)은 과립구 및 적혈구를 포함하는데, 단핵 세포를 단리하도록 구성되며 도 2의 제1 층 (32)으로부터 잔존하는 시약을 함유하는 층 (32a)의 아래로 이동하여 있다. 층 (38)은 단핵 세포를 실질적으로 포함하며, 층 (40)은 혈장 및 혈소판을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (18)는 용기 (30) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 350배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (18)는 용기 (30) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (18)는 용기 (30) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 450배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 원심분리기는 약 5분 내지 약 30분으로 전개되어 원하는 결과를 달성할 수 있다.

[0029] 내용물에 대한 원심력의 양 및/또는 원심분리기가 작동되는 시간량을 조절하는 것 이외에, 사용자는 원심분리기의 경사 상향(ramp up) 및 경사 하향(ramp down), 다른 말로 하면 정지 조건으로부터 선택된 원심력에 도달하는 데에 필요한 시간, 및 지정하여 선택된 원심력으로부터 정지 조건에 도달하는 데에 필요한 시간을 조절하는 것을 선택할 수도 있다. 통상적인 원심분리기에서, 이는 원하는 일정한 작동 속도에 도달할 때까지의 회전 속도 (예컨대 RPM)의 가속 상향, 및 정지 조건까지의 (원하는 일정한 작동 속도로부터의) 회전 속도의 감속 하향에 해당한다. 이러한 두 가지 요소 중 하나 또는 모두의 조절은 원심분리의 효과성을 더 최적화하는 데에 사용될 수 있다. 실질적으로 0인 원심력으로부터 원하는 원심력으로의 경사 상향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 15분 또는 약 1분 내지 약 5분일 수 있다. 원하는 원심력으로부터 실질적으로 0인 원심력으로의 경사 하향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 20분 또는 약 1분 내지 약 10분일 수 있다.

[0030] 단계 (20)에서는, 단핵 세포 층 (38)으로부터의 단핵 세포가 용기 (30)로부터 제거되어 락테이트화된 링거 용액과 조합됨으로써, 단핵 세포 용액이 생성된다. 용기 (30)로부터의 단핵 세포의 제거 전에, 먼저 층 (40)이 제거됨으로써 (도 5), 층 (38)을 제거하는 것을 더 용이하게 할 수도 있다. 층 (40)을 제거할 때에는 예를 들면 멸균 피펫의 사용에 의해 층 (38)이 교란되지 않도록 주의를 기울일 수 있다. 단계 (22)에서는, 단핵 세포가

락테이트화된 링거 용액과 활발하게 (그러나 온건하게) 혼합된다. 단핵 세포는 락테이트화된 링거 용액을 사용하여 1회, 2회 또는 그 이상 횟수로 세척될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-확장 세포 군집을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-혼합수집(non-pooled) 세포 군집을 포함한다. 혈소판 또는 혈장 단백질에 의한 임의의 불필요한 오염을 최소화하기 위하여, 층 (40)은 층 (38)을 제거하기 전에 실질적으로 제거된다는 것을 주지해야 한다. 층 (38)을 제거할 때 층 (32a)이 실질적으로 교란되지 않고 유지됨으로써, 과립구에 의한 임의의 불필요한 오염이 최소화된다는 것 역시 주지해야 한다.

[0031] 단계 (22)에서는, 단핵 세포 용액의 일부 또는 실질적으로 모든 단핵 세포 용액 중 어느 하나의 부피 V_5를 사용하여, 부피 V_5 중 살아있는 세포의 수 N_L을 추정한다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 CD34+ 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 총 유핵 세포 (TNC) 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 적어도 부분적으로 자동화된 세포 계수기를 사용하여 수행된다. 대안적인 방법들이 세포 계수를 수행하는 데에 사용될 수 있는데, 하기가 포함된다: 트라이판 블루 염색에 후속하는 혈구계, ATP 시험, 칼세인 AM, 클론원성 검정, 에티듐 단일이량체 검정, 에반스 블루, 플루오레세인 디아세테이트 가수분해/프로피듐 아이오다이드 염색 (FDA/PI 염색), 유동 세포측정법, 포르마잔-기반-검정 (MTT/XTT), 녹색 형광 단백질, 락테이트 데히드로제나제 (LDH), 메틸 바이올렛, 프로피듐 아이오다이드 DNA 염색 (괴사, 세포자멸사 및 정상 세포를 구별함), 레사주린, 사멸된 세포의 세포막만을 횡단하는 트라이판 블루 또는 턴넬 (TUNEL) 검정. 단계 (22)의 종료시에는, 실질적으로 모든 락테이트화된 링거 용액이 부피 V_5로부터 제거될 수 있다. 단계 (24)에서는, 적어도 부분적으로 살아있는 세포의 추정된 수 N_L을 기반으로, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 계산, 추정 또는 결정된 부피 V_6이 단핵 세포 용액 중 적어도 일부의 부피 V_5에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 부피 V_6의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 세포 중 대략 75 %가 냉동 및 해동 후 생존가능할 것이라는 가정을 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_6의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 2백 5십만개의 살아있는 세포 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 극저온으로 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 극저온 저장은 약 -60 ℃ 미만이다. 일부 실시양태에서, 극저온 저장은 약 -80 ℃ 미만이다. 일부 실시양태에서, 부피 V_6의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 2백 5십만개의 살아있는 세포 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있으며, 조합된 조성물에 알부민을 첨가하고 조합된 조성물을 극저온으로 저장한 후 이와 같은 살아있는 세포 농도가 이루어질 것임을 가정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_6의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 9백 8십만개의 살아있는 세포 내지 약 1천 2십만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 덱스트로스 중 저분자량 덱스트란은 LMD (덱스트란 40)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 첨가되는 부피 V_6은 식 $V_6 = K \times N_L$에 부합하며, 여기서 K는 약 7.35×10^{-8} ml/세포 내지 약 3.00×10^{-7} ml/세포이고, N_L은 단핵 세포 용액의 20 ml 부분 중 살아있는 세포의 수이다.

[0032] 일부 실시양태에서, 첨가되는 부피 V_6은 식 $V_6 = K \times N_L$에 부합하며, 여기서 K는 약 7.35×10^{-8} ml/세포 내지 약 7.50×10^{-8} ml/세포이고, N_L은 단핵 세포 용액의 20 ml 부분 중 살아있는 세포의 수이다.

[0033] 단계 (26)에서는, 필요할 경우, 원하는 범위 내의 pH를 산출하기 위하여, 단핵 세포 용액과 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 조합된 조성물의 pH가 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH는 소듐 비카르보네이트 분말과 같은 소듐 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 칼슘 비카르보네이트 액체와 같은 칼슘 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 8.5로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.4로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 단계 (28)에서는, 알부민이 조합된 조성물에 첨가된다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 15 mg 내지 약 30 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 18 mg 내지 약 25 mg의 알부민이

첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 20 mg의 알부민이 첨가될 수 있다.

[0034] 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 생물활성 작용제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상기 1종 이상의 생물활성 작용제에는 시토카인 또는 성장 인자가 포함될 수 있는데, 인간 제대혈로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (10)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 동일한 샘플로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (10)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 아닌 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (10)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플과 다른 공여자로부터의 것인 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 수득되거나 유래된다.

[0036] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함할 수 있다. 생물활성 작용제에는 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β) 및 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12) 및 인터류킨 13 (IL-13)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL) 및 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α). 생물활성 작용제에는 또한 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2)를 포함한 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3) 및 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF).

[0037] 일부 실시양태에서는, DMSO가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 유해 효과를 방지하기 위하여, 어떠한 단계에서도 디메틸 술폭시드 (DMSO)가 조성물에 첨가되지 않음으로써, 조성물이 실질적으로 무-DMSO로 유지된다. 조합된 조성물은 이후 예를 들면 초-저온 냉동기 중 극저온 바이알에서 극저온으로 저장될 수 있다. 상기 극저온 저장은 -60 ℃ 미만 또는 -80 ℃ 미만의 온도로 조절될 수 있다.

[0038] 제2 실시양태에 따라, 본원에서 기술되는 실시양태들과 같은 조성물의 제조 방법을 기술한다. 도 6의 단계 (100)에서는, 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이 수득된다. 인간 제대혈은 통상적으로 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함한다. 단계 (102)에서는, 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 부피 V_{PC}인 미네소타 블루밍턴 소재 바이오-E, LLC 사의 프레파사이트®-CB 용액, 또는 등가의 응집제 또는 침강제와 조합된다. 부피 V_{UC} 및 V_{PC} 중 어느 하나 또는 둘 다는 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.60 내지 약 1.75가 되도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.10이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 1.25 내지 약 1.75이다. 조합된 부피 V_{UC} 및 V_{PC}는 상청액이 형성될 때까지, 또는 적어도 2개의 구별되는 층이 형성될 때까지, 적어도 약 20분 또는 적어도 약 30분 동안 교란되지 않고 방치된다. 단계 (104)에서는, 원심력에 적용되도록 구성된 용기 (168) (예컨대 원심분리기 튜브)에 부분적으로 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약 (170) (도 7)이 충전되는데, 상기 시약 (170)은 부피 V_R을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 시약 (170)은 스웨덴 웁살라 소재 GE 헬스케어 바이오-사이언시즈 AB 사의 피콜-패크® 원심분리 매질, 또는 등가의 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)은 피콜-패크® 플러스 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)은 피콜-패크® 프리미엄 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)은 약 1.0 그램/ml 내지 약 1.3 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)은 약 1.07 그램/ml 내지 약 1.09 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)은 약 1.073 그램/ml 내지 약 1.084 그램/ml의 밀도를 갖는다. 시약 (170)의 부피 V_R은 용기 (168) 내의 제1 층 (172) (예컨대 저부 층)를 나타낸다. 또한, 단계 (104)의 일부로서, 도 7에 나타낸 바와 같이, 단계 (102)에서 생성된 부피 V_S의 상청액 (176)을 포함하는 제2 층 (174)이 용기 (168) 내의 제1 층 (172)상에 층상화된다. 시약 (170)의 층 (172)의 부피 V_R은 상청액 (176)의 층 (174)의 부피 V_S의 적어도 67 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)의 층 (172)의 부피 V_R은 상청액 (176)의 층 (174)의 부피 V_S의 적어도

75 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)의 층 (172)의 부피 V_R은 상청액 (176)의 층 (174)의 부피 V_S의 적어도 85 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)의 층 (172)의 부피 V_R은 상청액 (176)의 층 (174)의 부피 V_S의 약 30 % 내지 약 135 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)의 층 (172)의 부피 V_R은 상청액 (176)의 층 (174)의 부피 V_S의 약 50 % 내지 약 100 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (170)의 층 (172)의 부피 V_R은 상청액 (176)의 층 (174)의 부피 V_S의 약 75 % 내지 약 100 %이다. 2개 층 (172), (174) 사이의 구별되는 경계면이 우선적으로 요구되는 경우, 상기 제2 층 (174)은 느리거나, 적어도 온건하거나, 또는 비-교란성인 방식 (예컨대 저속 피펫팅)으로 제1 층 (172)상에 첨가되어야 한다.

[0039] 단계 (106)에서는, 원심력 성분 (178)이 폐쇄된 용기 단부 (180) 방향으로 향하도록 용기 (168) (도 8) 및 그의 내용물 (예컨대 제1 층 (172) 및 제2 층 (174))에 충분한 원심력 성분 (178)이 인가됨으로써, 도 9에 나타낸 바와 같은 층상화의 형성이 야기된다. 도 8은 중심점 (184) 주변의 원형 경로 (182)로 용기 (168)를 회전시키는 원심분리기 (46)의 기본적인 역학을 도시한다. 용기 (168)는 예를 들면 회전을 위하여 원심분리기 (46) 내의 적절한 위치에 조심스럽게 위치될 수 있다. 도 9에서, 층 (186)은 과립구 및 적혈구를 포함하는데, 시약 (170)을 함유하며 도 7의 제1 층 (172)으로부터 잔존하는 층 (172a)의 아래로 이동하여 있다. 층 (188)은 단핵 세포를 실질적으로 포함하며, 층 (190)은 혈장 및 혈소판을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (106)는 용기 (168) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 350배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (106)는 용기 (168) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (106)는 용기 (168) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 450배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (106)는 용기 (168) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 600배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (106)는 용기 (168) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 800배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (106)는 용기 (168) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 1400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 원심분리기는 약 5분 내지 약 30분으로 전개되어 원하는 결과를 달성할 수 있다.

[0040] 내용물에 대한 원심력의 양 및/또는 원심분리기가 작동되는 시간량을 조절하는 것 이외에, 사용자는 원심분리기의 경사 상향 및 경사 하향, 다른 말로 하면 정지 조건으로부터 선택된 원심력에 도달하는 데에 필요한 시간, 및 지정하여 선택된 원심력으로부터 정지 조건에 도달하는 데에 필요한 시간을 조절하는 것을 선택할 수도 있다. 통상적인 원심분리기에서, 이는 원하는 일정한 작동 속도에 도달할 때까지의 회전 속도 (예컨대 RPM)의 가속 상향, 및 정지 조건까지의 (원하는 일정한 작동 속도로부터의) 회전 속도의 감속 하향에 해당한다. 이러한 두 가지 요소 중 하나 또는 모두의 조절은 원심분리의 효과성을 더 최적화하는 데에 사용될 수 있다. 실질적으로 0인 원심력으로부터 원하는 원심력으로의 경사 상향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 15분 또는 약 1분 내지 약 5분일 수 있다. 원하는 원심력으로부터 실질적으로 0인 원심력으로의 경사 하향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 20분 또는 약 1분 내지 약 10분일 수 있다.

[0041] 단계 (108)에서는, 단핵 세포 층 (188)으로부터의 단핵 세포가 용기 (168)로부터 제거되어 락테이트화된 링거 용액과 조합됨으로써, 단핵 세포 용액이 생성된다. 용기 (168)로부터의 단핵 세포의 제거 전에, 먼저 층 (190)이 제거됨으로써 (도 10), 층 (188)을 제거하는 것을 더 용이하게 할 수도 있다. 층 (190)을 제거할 때에는 예를 들면 멸균 피펫의 사용에 의해 층 (188)이 교란되지 않도록 주의를 기울일 수 있다. 단계 (108)에서는, 단핵 세포 층 (188)으로부터의 단핵 세포가 락테이트화된 링거 용액과 활발하게 (그러나 온건하게) 혼합된다. 단핵 세포는 락테이트화된 링거 용액을 사용하여 1회, 2회 또는 그 이상 횟수로 세척될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-확장 세포 군집을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-혼합수집 세포 군집을 포함한다. 혈소판 또는 혈장 단백질에 의한 임의의 불필요한 오염을 최소화하기 위하여, 층 (190)은 층 (188)으로부터의 단핵 세포를 제거하기 전에 실질적으로 제거된다는 것을 주지해야 한다. 층 (188)을 제거할 때 층 (172a)이 실질적으로 교란되지 않고 유지됨으로써, 층 (186)의 과립구에 의한 임의의 불필요한 오염이 최소화된다는 것 역시 주지해야 한다.

[0042] 단계 (110)에서는, 단핵 세포 용액의 일부 또는 실질적으로 모든 단핵 세포 용액 중 어느 하나의 부피 V_M을 사용하여, 부피 V_M 중 살아있는 세포의 수 N_L을 추정한다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 CD34+ 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 총 유핵 세포 (TNC) 계수를 수행하는 것에 의해 수행

된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 적어도 부분적으로 자동화된 세포 계수기를 사용하여 수행된다. 대안적인 방법들이 세포 계수를 수행하는 데에 사용될 수 있는데, 하기가 포함된다: 트라이판 블루 염색에 후속하는 혈구계, ATP 시험, 칼세인 AM, 클론원성 검정, 에티듐 단일이량체 검정, 에반스 블루, 플루오레세인 디아세테이트 가수분해/프로피듐 아이오다이드 염색 (FDA/PI 염색), 유동 세포측정법, 포르마잔-기반-검정 (MTT/XTT), 녹색 형광 단백질, 락테이트 데히드로제나제 (LDH), 메틸 바이올렛, 프로피듐 아이오다이드 DNA 염색 (괴사, 세포자멸사 및 정상 세포를 구별함), 레사주린, 사멸된 세포의 세포막만을 횡단하는 트라이판 블루 또는 턴넬 검정. 단계 (110)의 종료시에는, 실질적으로 모든 락테이트화된 링거 용액이 부피 V_M으로부터 제거될 수 있다.

[0043] 단계 (112)에서는, 알부민이 조합된 조성물에 첨가된다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 50 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 50 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 80 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 80 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 105 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 105 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 15 mg 내지 약 30 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 18 mg 내지 약 25 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 20 mg의 알부민이 첨가될 수 있다.

[0044] 일부 실시양태에서는, 알부민의 첨가 동안 또는 그 전에, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란이 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 부피 V_M에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 양은 적어도 부분적으로는 계산, 추정 또는 측정된 살아있는 세포의 추정 수 N_L을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 첨가되는 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 세포 중 대략 75 %가 냉동 및 해동 후 생존가능할 것이라는 가정을 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 100,000개의 살아있는 세포 내지 약 7천 5백만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 750,000개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 극저온으로 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 2천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 극저온 저장은 약 -60 ℃ 미만이다. 일부 실시양태에서, 극저온 저장은 약 -80 ℃ 미만이다.

[0045] 일부 실시양태에서는, 필요할 경우, 원하는 범위 내의 pH를 산출하기 위하여, 조합된 조성물의 pH가 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH는 소듐 비카르보네이트 분말과 같은 소듐 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 칼슘 비카르보네이트 용액과 같은 칼슘 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 8.5로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.4로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다.

[0046] 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 생물활성 작용제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상기 1종 이상의 생물활성 작용제에는 시토카인 또는 성장 인자가 포함될 수 있는데, 인간 제대혈로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (100)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 동일한 샘플로부터 수득되

거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (100)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 아닌 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (100)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플과 다른 공여자로부터의 것인 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 수득되거나 유래된다.

[0048] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함할 수 있다. 생물활성 작용제에는 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β), 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 에오탁신, CXC 리간드 1 (GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNFβ).

[0049] 일부 실시양태에서는, DMSO가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 유해 효과를 방지하기 위하여, 어떠한 단계에서도 디메틸 술폭시드 (DMSO)가 조성물에 첨가되지 않음으로써, 조성물이 실질적으로 무-DMSO로 유지된다. 조합된 조성물은 이후 예를 들면 초-저온 냉동기 중 극저온 바이알에서 극저온으로 저장될 수 있다. 상기 극저온 저장은 -60 ℃ 미만 또는 -80 ℃ 미만의 온도로 조절될 수 있다.

[0050] 제3 실시양태에 따라, 본원에서 기술되는 실시양태들과 같은 조성물의 제조 방법을 기술한다. 도 11의 단계 (200)에서는, 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이 수득된다. 인간 제대혈은 통상적으로 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함한다. 단계 (202)에서는, 도 12에 나타낸 바와 같이, 제1 유연성 용기 (267) 내에서 인간 제대혈을 포함하는 샘플 (271)이 부피 V_{PC}인 미네소타 블루밍턴 소재 바이오-E, LLC 사의 프레파사이트®-CB 용액 (273), 또는 등가의 응집제 또는 침강제와 혼합된다. 인간 제대혈을 포함하는 샘플 (271), 또는 심지어는 부피 V_{PC}의 프레파사이트®-CB 용액 (273)을 삽입하기 위하여, 제1 유연성 용기 (267)에 연결된 스파이크(spike) (277) 및 삽입 튜브 (279)가 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 부피 V_{PC}의 프레파사이트®-CB 용액 (273)이 제1 유연성 용기 (267) 내에 미리 수용되어 있다. 부피 V_{UC} 및 V_{PC} 중 어느 하나 또는 둘 다는 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.60 내지 약 1.75가 되도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.10이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 1.25 내지 약 1.75이다. 단계 (204)에서는, 혼합된 부피 $V_{UC} + V_{PC}$가 상청액 (275)이 형성될 때까지 적어도 20분 동안 제1 유연성 용기 내에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 혼합된 부피 $V_{UC} + V_{PC}$는 적어도 30분 동안 제1 유연성 용기 (267) 내에서 유지된다. 단계 (206)에서는, 도 14에 나타낸 바와 같이, 상청액 (275)의 적어도 일부가 제2 유연성 용기 (268)에 제1 유연성 용기 (267)를 연결하는 도관 (269)을 통하여 제1 유연성 용기 (267)로부터 제2 유연성 용기 (268)로 (화살표) 밀어내어진다. 단계 (208)에서는, 제2 유연성 용기 (268)가 원심분리기에 위치된 후, 원심분리기가 작동됨으로써, 제2 유연성 용기 (268) 내의 상청액에 원심력이 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 유연성 용기 (267)는 예를 들면 도관 (269)을 절단하는 것에 의해 제2 유연성 용기 (268)로부터 제거되어, 폐기될 수 있다. 제2 유연성 용기 (268)로부터 연장되는 절단된 도관 (269)의 부분은 절단 후 클램핑 밀봉될 수 있다. 원심력 성분 (278)이 폐쇄된 용기 단부 (280) 방향으로 향하도록 제2 유연성 용기 (268) (도 13) 및 그의 내용물에 충분한 원심력 성분 (278)이 인가됨으로써, 도 15에 나타낸 바와 같은 층상화의 형성이 야기된다. 도 13은 중심점 (284) 주변의 원형 경로 (282)로 제2 유연성 용기 (268)를 회전시키는 원심분리기 (46)의 기본적인 역학을 도시한다. 제2 유연성 용기 (268)는 예를 들면 회전을 위하여 원심분리기 (46) 내의 적절한 위치에 조심스럽게 위치될 수 있다. 도 15에서, 층 (286)은 과립구 및 적혈구를 포함하며, 층 (272a)은 나머지 프레파사이트®-CB 용액 (273)을 포함한다. 층 (288)은 단핵 세포를 실

질적으로 포함하며, 층 (290)은 혈장 및 혈소판을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (208)는 제2 유연성 용기 (268) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 350배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (208)는 제2 유연성 용기 (268) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (208)는 제2 유연성 용기 (268) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 450배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (208)는 제2 유연성 용기 (268) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 600배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (208)는 제2 유연성 용기 (268) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 800배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (208)는 용기 (268) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 1400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 원심분리기는 약 5분 내지 약 30분으로 전개되어 원하는 결과를 달성할 수 있다.

[0051] 내용물에 대한 원심력의 양 및/또는 원심분리기가 작동되는 시간량을 조절하는 것 이외에, 사용자는 원심분리기의 경사 상향 및 경사 하향, 다른 말로 하면 정지 조건으로부터 선택된 원심력에 도달하는 데에 필요한 시간, 및 지정하여 선택된 원심력으로부터 정지 조건에 도달하는 데에 필요한 시간을 조절하는 것을 선택할 수도 있다. 통상적인 원심분리기에서, 이는 원하는 일정한 작동 속도에 도달할 때까지의 회전 속도 (예컨대 RPM)의 가속 상향, 및 정지 조건까지의 (원하는 일정한 작동 속도로부터의) 회전 속도의 감속 하향에 해당한다. 이러한 두 가지 요소 중 하나 또는 모두의 조절은 원심분리의 효과성을 더 최적화하는 데에 사용될 수 있다. 실질적으로 0인 원심력으로부터 원하는 원심력으로의 경사 상향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 15분 또는 약 1분 내지 약 5분일 수 있다. 원하는 원심력으로부터 실질적으로 0인 원심력으로의 경사 하향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 20분 또는 약 1분 내지 약 10분일 수 있다.

[0052] 단계 (210)에서는, 단핵 세포 층 (288)으로부터의 단핵 세포가 제2 유연성 용기 (268)로부터 제거되어, 단핵 세포 용액을 생성시키는 시약과 조합된다. 일부 실시양태에서, 상기 시약은 인간 혈청, 예를 들면 5 % 인간 혈청 알부민을 포함한다. 제2 유연성 용기 (268)로부터의 단핵 세포의 제거 전에, 먼저 층 (290)이 제거됨으로써, 층 (288)을 제거하는 것을 더 용이하게 할 수도 있다. 층 (290)을 제거할 때에는 예를 들면 멸균 피펫의 사용에 의해 층 (288)이 교란되지 않도록 주의를 기울일 수 있다. 층 (290)은 포트 또는 밸브 (283)를 갖는 추가적인 접속 튜브 (281)를 통하여 조심스럽게 제거될 수도 있다 (예컨대 바늘을 사용한 흡인에 의함). 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-확장 세포 군집을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-혼합수집 세포 군집을 포함한다. 혈소판 또는 혈장 단백질에 의한 임의의 불필요한 오염을 최소화하기 위하여, 층 (290)은 층 (288)으로부터의 단핵 세포를 제거하기 전에 실질적으로 제거된다는 것을 주지해야 한다. 층 (288)을 제거할 때 층 (272a)이 실질적으로 교란되지 않고 유지됨으로써, 층 (286)의 과립구에 의한 임의의 불필요한 오염이 최소화된다는 것 역시 주지해야 한다.

[0053] 단계 (212)에서는, 단핵 세포 용액의 일부 또는 실질적으로 모든 단핵 세포 용액 중 어느 하나의 부피 V_M을 사용하여, 부피 V_M 중 살아있는 세포의 수 N_L을 추정한다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 CD34+ 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 총 유핵 세포 (TNC) 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 적어도 부분적으로 자동화된 세포 계수기를 사용하여 수행된다. 대안적인 방법들이 세포 계수를 수행하는 데에 사용될 수 있는데, 하기가 포함된다: 트라이판 블루 염색에 후속하는 혈구계, ATP 시험, 칼세인 AM, 클론원성 검정, 에티듐 단일이량체 검정, 에반스 블루, 플루오레세인 디아세테이트 가수분해/프로피듐 아이오다이드 염색 (FDA/PI 염색), 유동 세포측정법, 포르마잔-기반-검정 (MTT/XTT), 녹색 형광 단백질, 락테이트 데히드로제나제 (LDH), 메틸 바이올렛, 프로피듐 아이오다이드 DNA 염색 (괴사, 세포자멸사 및 정상 세포를 구별함), 레사주린, 사멸된 세포의 세포막만을 횡단하는 트라이판 블루 또는 턴넬 검정. 단계 (212)의 종료시에는, 모든 시약이 부피 V_M으로부터 실질적으로 제거될 수 있다.

[0054] 단계 (214)에서는, 알부민이 조합된 조성물에 첨가된다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 50 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 50 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 80 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 80 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 105 mg 내지 약

150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 105 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 15 mg 내지 약 30 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 18 mg 내지 약 25 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 20 mg의 알부민이 첨가될 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서는, 알부민의 첨가 동안 또는 그 전에, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란이 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 부피 V_M에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 양은 적어도 부분적으로는 계산, 추정 또는 측정된 살아있는 세포의 추정 수 N_L을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 첨가되는 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 세포 중 대략 75 %가 냉동 및 해동 후 생존가능할 것이라는 가정을 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 100,000개의 살아있는 세포 내지 약 7천 5백만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 750,000개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 극저온으로 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 2천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 극저온 저장은 약 -60 ℃ 미만이다. 일부 실시양태에서, 극저온 저장은 약 -80 ℃ 미만이다.

[0056] 일부 실시양태에서는, 필요할 경우, 원하는 범위 내의 pH를 산출하기 위하여, 조합된 조성물의 pH가 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH는 소듐 비카르보네이트 분말과 같은 소듐 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 칼슘 비카르보네이트 용액과 같은 칼슘 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 8.5로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.4로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다.

[0057] 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 생물활성 작용제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상기 1종 이상의 생물활성 작용제에는 시토카인 또는 성장 인자가 포함될 수 있는데, 인간 제대혈로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (200)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 동일한 샘플로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (200)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 아닌 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (200)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플과 다른 공여자로부터의 것인 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 수득되거나 유래된다.

[0059] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함할 수 있다. 생물활성 작용제에는 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β), 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자

2 (FGF-2), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 에오탁신, CXC 리간드 1 (GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNFβ).

[0060] 일부 실시양태에서는, DMSO가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 유해 효과를 방지하기 위하여, 어떠한 단계에서도 디메틸 술폭시드 (DMSO)가 조성물에 첨가되지 않음으로써, 조성물이 실질적으로 무-DMSO로 유지된다. 조합된 조성물은 이후 예를 들면 초-저온 냉동기 중 극저온 바이알에서 극저온으로 저장될 수 있다. 상기 극저온 저장은 -60 ℃ 미만 또는 -80 ℃ 미만의 온도로 조절될 수 있다.

[0061] 제4 실시양태에 따라, 본원에서 기술되는 실시양태들과 같은 조성물의 제조 방법을 기술한다. 도 16의 단계 (300)에서는, 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이 수득된다. 인간 제대혈은 통상적으로 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함한다. 단계 (302)에서는, 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 부피 V_{PC}인 미네소타 블루밍턴 소재 바이오-E, LLC 사의 프레파사이트®-CB 용액, 또는 등가의 응집제 또는 침강제와 조합된다. 부피 V_{UC} 및 V_{PC} 중 어느 하나 또는 둘 다는 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.60 내지 약 1.75가 되도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.10이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 1.25 내지 약 1.75이다. 조합된 부피 V_{UC} 및 V_{PC}는 상청액이 형성될 때까지, 또는 적어도 2개의 구별되는 층이 형성될 때까지, 적어도 약 20분 또는 적어도 약 30분 동안 교란되지 않고 방치된다. 단계 (304)에서는, 원심력에 적용되도록 구성된 용기 (368) (예컨대 원심분리기 튜브)에 부분적으로 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약 (370) (도 17)이 충전되는데, 상기 시약 (370)은 부피 V_R을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 시약 (370)은 스웨덴 웁살라 소재 GE 헬스케어 바이오-사이언시즈 AB 사의 피콜-패크® 원심분리 매질, 또는 등가의 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)은 피콜-패크® 플러스 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)은 피콜-패크® 프리미엄 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)은 약 1.0 그램/ml 내지 약 1.3 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)은 약 1.07 그램/ml 내지 약 1.09 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)은 약 1.073 그램/ml 내지 약 1.084 그램/ml의 밀도를 갖는다. 시약 (370)의 부피 V_R은 용기 (368) 내의 제1 층 (372) (예컨대 저부 층)를 나타낸다. 또한, 단계 (304)의 일부로서, 도 17에 나타낸 바와 같이, 단계 (302)에서 생성된 부피 V_S의 상청액 (376)을 포함하는 제2 층 (374)이 용기 (368) 내의 제1 층 (372)상에 층상화된다. 시약 (370)의 층 (372)은 상청액 (376)의 층 (374)의 높이 또는 컬럼 높이 CH_S의 적어도 67 %인 높이 또는 컬럼 높이 CH_R로 층상화된다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)의 층 (372)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (376)의 층 (374)의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 75 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)의 층 (372)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (376)의 층 (374)의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 85 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)의 층 (372)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (376)의 층 (374)의 컬럼 높이 CH_S의 약 30 % 내지 약 135 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)의 층 (372)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (376)의 층 (374)의 컬럼 높이 CH_S의 약 50 % 내지 약 100 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (370)의 층 (372)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (376)의 층 (374)의 컬럼 높이 CH_S의 약 75 % 내지 약 100 %이다. 2개 층 (372), (374) 사이의 구별되는 경계면이 우선적으로 요구되는 경우, 상기 제2 층 (374)은 느리거나, 적어도 온건하거나, 또는 비-교란성인 방식 (예컨대 저속 피펫팅)으로 제1 층 (372)상에 첨가되어야 한다.

[0062] 단계 (306)에서는, 원심력 성분 (378)이 폐쇄된 용기 단부 (380) 방향으로 향하도록 용기 (368) (도 18) 및 그의 내용물 (예컨대 제1 층 (372) 및 제2 층 (374))에 충분한 원심력 성분 (378)이 인가됨으로써, 도 19에 나타낸 바와 같은 층상화의 형성이 야기된다. 도 18은 중심점 (384) 주변의 원형 경로 (382)로 용기 (368)를 회전시키는 원심분리기 (46)의 기본적인 역학을 도시한다. 용기 (368)는 예를 들면 회전을 위하여 원심분리기 (46) 내의 적절한 위치에 조심스럽게 위치될 수 있다. 도 19에서, 층 (386)은 과립구 및 적혈구를 포함하는데, 시약 (370)을 함유하며 도 17의 제1 층 (372)으로부터 잔존하는 층 (372a)의 아래로 이동하여 있다. 층 (388)은 단핵 세포를 실질적으로 포함하며, 층 (390)은 혈장 및 혈소판을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (306)는 용기 (368) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 350배를 인가하는 원심분리기를 사용하

여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (306)는 용기 (368) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (306)는 용기 (368) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 450배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (306)는 용기 (368) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 600배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (306)는 용기 (368) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 800배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (306)는 용기 (368) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 1400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 원심분리기는 약 5분 내지 약 30분으로 전개되어 원하는 결과를 달성할 수 있다.

[0063] 내용물에 대한 원심력의 양 및/또는 원심분리기가 작동되는 시간량을 조절하는 것 이외에, 사용자는 원심분리기의 경사 상향 및 경사 하향, 다른 말로 하면 정지 조건으로부터 선택된 원심력에 도달하는 데에 필요한 시간, 및 지정하여 선택된 원심력으로부터 정지 조건에 도달하는 데에 필요한 시간을 조절하는 것을 선택할 수도 있다. 통상적인 원심분리기에서, 이는 원하는 일정한 작동 속도에 도달할 때까지의 회전 속도 (예컨대 RPM)의 가속 상향, 및 정지 조건까지의 (원하는 일정한 작동 속도로부터의) 회전 속도의 감속 하향에 해당한다. 이러한 두 가지 요소 중 하나 또는 모두의 조절은 원심분리의 효과성을 더 최적화하는 데에 사용될 수 있다. 실질적으로 0인 원심력으로부터 원하는 원심력으로의 경사 상향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 15분 또는 약 1분 내지 약 5분일 수 있다. 원하는 원심력으로부터 실질적으로 0인 원심력으로의 경사 하향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 20분 또는 약 1분 내지 약 10분일 수 있다.

[0064] 단계 (308)에서는, 단핵 세포 층 (388)으로부터의 단핵 세포가 용기 (368)로부터 제거되어 락테이트화된 링거 용액과 조합됨으로써, 단핵 세포 용액이 생성된다. 용기 (368)로부터의 단핵 세포의 제거 전에, 먼저 층 (390)이 제거됨으로써 (도 20), 층 (388)을 제거하는 것을 더 용이하게 할 수도 있다. 층 (390)을 제거할 때에는 예를 들면 멸균 피펫의 사용에 의해 층 (388)이 교란되지 않도록 주의를 기울일 수 있다. 단계 (308)에서는, 단핵 세포 층 (388)으로부터의 단핵 세포가 락테이트화된 링거 용액과 활발하게 (그러나 온건하게) 혼합된다. 단핵 세포는 락테이트화된 링거 용액을 사용하여 1회, 2회 또는 그 이상 횟수로 세척될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-확장 세포 군집을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-혼합수집 세포 군집을 포함한다. 혈소판 또는 혈장 단백질에 의한 임의의 불필요한 오염을 최소화하기 위하여, 층 (390)은 층 (388)으로부터의 단핵 세포를 제거하기 전에 실질적으로 제거된다는 것을 주지해야 한다. 층 (388)을 제거할 때 층 (372a)이 실질적으로 교란되지 않고 유지됨으로써, 층 (386)의 과립구에 의한 임의의 불필요한 오염이 최소화된다는 것 역시 주지해야 한다.

[0065] 단계 (310)에서는, 단핵 세포 용액의 일부 또는 실질적으로 모든 단핵 세포 용액 중 어느 하나의 부피 V_M을 사용하여, 부피 V_M 중 살아있는 세포의 수 N_L을 추정한다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 CD34+ 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 총 유핵 세포 (TNC) 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 적어도 부분적으로 자동화된 세포 계수기를 사용하여 수행된다. 대안적인 방법들이 세포 계수를 수행하는 데에 사용될 수 있는데, 하기가 포함된다: 트라이판 블루 염색에 후속하는 혈구계, ATP 시험, 칼세인 AM, 클론원성 검정, 에티듐 단일이량체 검정, 에반스 블루, 플루오레세인 디아세테이트 가수분해/프로피듐 아이오다이드 염색 (FDA/PI 염색), 유동 세포측정법, 포르마잔-기반-검정 (MTT/XTT), 녹색 형광 단백질, 락테이트 데히드로제나제 (LDH), 메틸 바이올렛, 프로피듐 아이오다이드 DNA 염색 (괴사, 세포자멸사 및 정상 세포를 구별함), 레사주린, 사멸된 세포의 세포막만을 횡단하는 트라이판 블루 또는 턴넬 검정. 단계 (310)의 종료시에는, 실질적으로 모든 락테이트화된 링거 용액이 부피 V_M으로부터 제거될 수 있다.

[0066] 단계 (312)에서는, 알부민이 조합된 조성물에 첨가된다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 10 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 50 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 50 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 80 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 80 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 105 mg 내지 약 150 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 105 mg 내지 약 120 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 15 mg 내지 약 30

mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 18 mg 내지 약 25 mg의 알부민이 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 조합된 조성물 1 밀리리터 당 약 20 mg의 알부민이 첨가될 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서는, 알부민의 첨가 동안 또는 그 전에, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란이 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 부피 V_M에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 양은 적어도 부분적으로는 계산, 추정 또는 측정된 살아있는 세포의 추정 수 N_L을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 첨가되는 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 세포 중 대략 75 %가 냉동 및 해동 후 생존가능할 것이라는 가정을 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 100,000개의 살아있는 세포 내지 약 7천 5백만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 750,000개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 극저온으로 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 2천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 극저온 저장은 약 -60 ℃ 미만이다. 일부 실시양태에서, 극저온 저장은 약 -80 ℃ 미만이다.

[0068] 일부 실시양태에서는, 필요할 경우, 원하는 범위 내의 pH를 산출하기 위하여, 조합된 조성물의 pH가 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH는 소듐 비카르보네이트 분말과 같은 소듐 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 칼슘 비카르보네이트 용액과 같은 칼슘 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 8.5로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.4로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다.

[0069] 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함한다.

[0070] 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 생물활성 작용제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상기 1종 이상의 생물활성 작용제에는 시토카인 또는 성장 인자가 포함될 수 있는데, 인간 제대혈로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (300)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 동일한 샘플로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (300)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 아닌 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (300)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플과 다른 공여자로부터의 것인 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 수득되거나 유래된다.

[0071] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함할 수 있다. 생물활성 작용제에는 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β), 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 에오탁신, CXC 리간드 1

(GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNFβ).

[0072] 일부 실시양태에서는, DMSO가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 유해 효과를 방지하기 위하여, 어떠한 단계에서도 디메틸 술폭시드 (DMSO)가 조성물에 첨가되지 않음으로써, 조성물이 실질적으로 무-DMSO로 유지된다. 조합된 조성물은 이후 예를 들면 초-저온 냉동기 중 극저온 바이알에서 극저온으로 저장될 수 있다. 상기 극저온 저장은 -60 ℃ 미만 또는 -80 ℃ 미만의 온도로 조절될 수 있다.

[0073] 제5 실시양태에 따라, 본원에서 기술되는 실시양태들과 같은 조성물의 제조 방법을 기술한다. 도 21의 단계 (400)에서는, 인간 제대혈을 포함하며 제1 부피 V_{UC}를 갖는 샘플이 수득된다. 인간 제대혈은 통상적으로 적혈구, 적혈구가 아닌 다른 세포 및 비-세포성 물질을 포함한다. 단계 (402)에서는, 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 부피 V_{PC}인 미네소타 블루밍턴 소재 바이오-E, LLC 사의 프레파사이트®-CB 용액, 또는 등가의 응집제 또는 침강제와 조합된다. 부피 V_{UC} 및 V_{PC} 중 어느 하나 또는 둘 다는 비 V_{UC}/V_{PC}가 약 0.60 내지 약 1.75가 되도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.75 내지 약 1.25이다. 일부 실시양태에서, 비 V_{UC}/V_{PC}는 약 0.60 내지 약 1.10이다. 조합된 부피 V_{UC} 및 V_{PC}는 상청액이 형성될 때까지, 또는 적어도 2개의 구별되는 층이 형성될 때까지, 적어도 약 20분 또는 적어도 약 30분 동안 교란되지 않고 방치된다. 단계 (404)에서는, 원심력에 적용되도록 구성된 용기 (468) (예컨대 원심분리기 튜브)에 부분적으로 단핵 세포를 단리하도록 구성된 시약 (470) (도 22)이 충전되는데, 상기 시약 (470)은 부피 V_R을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 시약 (470)은 스웨덴 웁살라 소재 GE 헬스케어 바이오-사이언시즈 AB 사의 피콜-패크® 원심분리 매질, 또는 등가의 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)은 피콜-패크® 플러스 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)은 피콜-패크® 프리미엄 원심분리 매질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)은 약 1.0 그램/ml 내지 약 1.3 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)은 약 1.07 그램/ml 내지 약 1.09 그램/ml의 밀도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)은 약 1.073 그램/ml 내지 약 1.084 그램/ml의 밀도를 갖는다. 시약 (470)의 부피 V_R은 용기 (468) 내의 제1 층 (472) (예컨대 저부 층)을 나타낸다. 또한, 단계 (404)의 일부로서, 도 22에 나타낸 바와 같이, 단계 (402)에서 생성된 부피 V_S의 상청액 (476)을 포함하는 제2 층 (474)이 용기 (468) 내의 제1 층 (472)상에 층상화된다. 시약 (470)의 층 (472)은 상청액 (476)의 층 (474)의 높이 또는 컬럼 높이 CH_S의 적어도 67 %인 높이 또는 컬럼 높이 CH_R로 층상화된다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)의 층 (472)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (476)의 층 (474)의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 75 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)의 층 (472)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (476)의 층 (474)의 컬럼 높이 CH_S의 적어도 85 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)의 층 (472)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (476)의 층 (474)의 컬럼 높이 CH_S의 약 30 % 내지 약 135 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)의 층 (472)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (476)의 층 (474)의 컬럼 높이 CH_S의 약 50 % 내지 약 100 %이다. 일부 실시양태에서, 시약 (470)의 층 (472)의 컬럼 높이 CH_R은 상청액 (476)의 층 (474)의 컬럼 높이 CH_S의 약 75 % 내지 약 100 %이다. 2개 층 (472), (474) 사이의 구별되는 경계면이 우선적으로 요구되는 경우, 상기 제2 층 (474)은 느리거나, 적어도 온건하거나, 또는 비-교란성인 방식 (예컨대 저속 피펫팅)으로 제1 층 (472)상에 첨가되어야 한다.

[0074] 단계 (406)에서는, 원심력 성분 (478)이 폐쇄된 용기 단부 (480) 방향으로 향하도록 용기 (468) (도 23) 및 그의 내용물 (예컨대 제1 층 (472) 및 제2 층 (474))에 충분한 원심력 성분 (478)이 인가됨으로써, 도 24에 나타낸 바와 같은 층상화의 형성이 야기된다. 도 23은 중심점 (484) 주변의 원형 경로 (482)로 용기 (468)를 회전시키는 원심분리기 (46)의 기본적인 역학을 도시한다. 용기 (468)는 예를 들면 회전을 위하여 원심분리기 (46) 내의 적절한 위치에 조심스럽게 위치될 수 있다. 도 24에서, 층 (486)은 과립구 및 적혈구를 포함하는데, 시약 (470)을 함유하며 도 22의 제1 층 (472)로부터 잔존하는 층 (472a)의 아래로 이동하여 있다. 층 (488)은 단핵 세포를 실질적으로 포함하며, 층 (490)은 혈장 및 혈소판을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (406)는 용기 (468) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 350배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (406)는 용기 (468) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (406)는 용기 (468) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 450배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수

있다. 일부 실시양태에서, 단계 (406)는 용기 (468) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 600배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (406)는 용기 (468) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 800배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (406)는 용기 (468) 및 그의 내용물에 대하여 중력 가속도의 적어도 약 1400배를 인가하는 원심분리기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 원심분리기는 약 5분 내지 약 30분으로 전개되어 원하는 결과를 달성할 수 있다.

[0075] 내용물에 대한 원심력의 양 및/또는 원심분리기가 작동되는 시간량을 조절하는 것 이외에, 사용자는 원심분리기의 경사 상향 및 경사 하향, 다른 말로 하면 정지 조건으로부터 선택된 원심력에 도달하는 데에 필요한 시간, 및 지정하여 선택된 원심력으로부터 정지 조건에 도달하는 데에 필요한 시간을 조절하는 것을 선택할 수도 있다. 통상적인 원심분리기에서, 이는 원하는 일정한 작동 속도에 도달할 때까지의 회전 속도 (예컨대 RPM)의 가속 상향, 및 정지 조건까지의 (원하는 일정한 작동 속도로부터의) 회전 속도의 감속 하향에 해당한다. 이러한 두 가지 요소 중 하나 또는 모두의 조절은 원심분리의 효과성을 더 최적화하는 데에 사용될 수 있다. 실질적으로 0인 원심력으로부터 원하는 원심력으로의 경사 상향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 15분 또는 약 1분 내지 약 5분일 수 있다. 원하는 원심력으로부터 실질적으로 0인 원심력으로의 경사 하향을 위한 시간은 약 30초 내지 약 20분 또는 약 1분 내지 약 10분일 수 있다.

[0076] 단계 (408)에서는, 단핵 세포 층 (488)으로부터의 단핵 세포가 용기 (468)로부터 제거되어 락테이트화된 링거 용액과 조합됨으로써, 단핵 세포 용액이 생성된다. 용기 (468)로부터의 단핵 세포의 제거 전에, 먼저 층 (490)이 제거됨으로써 (도 25), 층 (488)을 제거하는 것을 더 용이하게 할 수도 있다. 층 (490)을 제거할 때에는 예를 들면 멸균 피펫의 사용에 의해 층 (488)이 교란되지 않도록 주의를 기울일 수 있다. 단계 (408)에서는, 단핵 세포 층 (488)으로부터의 단핵 세포가 락테이트화된 링거 용액과 활발하게 (그러나 온건하게) 혼합된다. 단핵 세포는 락테이트화된 링거 용액을 사용하여 1회, 2회 또는 그 이상 횟수로 세척될 수도 있다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-확장 세포 군집을 실질적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 비-혼합수집 세포 군집을 포함한다. 혈소판 또는 혈장 단백질에 의한 임의의 불필요한 오염을 최소화하기 위하여, 층 (490)은 층 (488)으로부터의 단핵 세포를 제거하기 전에 실질적으로 제거된다는 것을 주지해야 한다. 층 (488)을 제거할 때 층 (472a)이 실질적으로 교란되지 않고 유지됨으로써, 층 (486)의 과립구에 의한 임의의 불필요한 오염이 최소화된다는 것 역시 주지해야 한다.

[0077] 단계 (410)에서는, 단핵 세포 용액의 일부 또는 실질적으로 모든 단핵 세포 용액 중 어느 하나의 부피 V_M을 사용하여, 부피 V_M 중 살아있는 세포의 수 N_L을 추정한다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 CD34+ 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 총 유핵 세포 (TNC) 계수를 수행하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 추정은 적어도 부분적으로 자동화된 세포 계수기를 사용하여 수행된다. 대안적인 방법들이 세포 계수를 수행하는 데에 사용될 수 있는데, 하기가 포함된다: 트라이판 블루 염색에 후속하는 혈구계, ATP 시험, 칼세인 AM, 클론원성 검정, 에티듐 단일이량체 검정, 에반스 블루, 플루오레세인 디아세테이트 가수분해/프로피듐 아이오다이드 염색 (FDA/PI 염색), 유동 세포측정법, 포르마잔-기반-검정 (MTT/XTT), 녹색 형광 단백질, 락테이트 데히드로제나제 (LDH), 메틸 바이올렛, 프로피듐 아이오다이드 DNA 염색 (괴사, 세포자멸사 및 정상 세포를 구별함), 레사주린, 사멸된 세포의 세포막만을 횡단하는 트라이판 블루 또는 턴넬 검정. 단계 (410)의 종료시에는, 실질적으로 모든 락테이트화된 링거 용액이 부피 V_M으로부터 제거될 수 있다.

[0078] 일부 실시양태에서는, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란이 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 부피 V_M에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 양은 적어도 부분적으로는 계산, 추정 또는 측정된 살아있는 세포의 추정 수 N_L을 기반으로 한다. 일부 실시양태에서, 첨가되는 덱스트로스 용액 중 저분자량 덱스트란의 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 단핵 세포 용액의 적어도 일부의 세포 중 대략 75 %가 냉동 및 해동 후 생존가능할 것이라는 가정을 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 100,000개의 살아있는 세포 내지 약 7천 5백만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 750,000개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 극저온으로 저장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 3천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다.

일부 실시양태에서, 부피 V_{DD}의 계산, 추정 또는 결정은 적어도 부분적으로 밀리리터 당 약 1천만개의 살아있는 세포 내지 약 2천만개의 살아있는 세포인 예정된 살아있는 세포 농도를 기반으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 극저온 저장은 약 -60 ℃ 미만이다. 일부 실시양태에서, 극저온 저장은 약 -80 ℃ 미만이다.

[0079] 일부 실시양태에서는, 필요할 경우, 원하는 범위 내의 pH를 산출하기 위하여, 조합된 조성물의 pH가 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH는 소듐 비카르보네이트 분말과 같은 소듐 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 칼슘 비카르보네이트 용액과 같은 칼슘 비카르보네이트를 첨가하는 것에 의해 조정된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 8.5로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 4.1 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.4로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 7.2로 조정되거나 거기에서 유지된다. 일부 실시양태에서, pH는 5.0 내지 6.2로 조정되거나 거기에서 유지된다.

[0080] 일부 실시양태에서, 단핵 세포 용액은 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 포함한다.

[0081] 일부 실시양태에서는, 1종 이상의 생물활성 작용제가 조성물에 첨가될 수 있다. 상기 1종 이상의 생물활성 작용제에는 시토카인 또는 성장 인자가 포함될 수 있는데, 인간 제대혈로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (400)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 동일한 샘플로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (400)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플이 아닌 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 단계 (400)에서 기술되는 인간 제대혈을 포함하는 샘플과 다른 공여자로부터의 것인 인간 제대혈로부터 수득되거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 또는 상업적으로 입수가능한 인간 알부민 혈청으로부터 수득되거나 유래된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 생물활성 작용제는 비제한적으로 시토카인 또는 성장 인자를 포함할 수 있다. 생물활성 작용제에는 하기 중 어느 것이 포함될 수 있다: 대식세포 염증 단백질 알파 (MIP-1α), 대식세포 염증 단백질 베타 (MIP-1β), 인터페론 감마-유도 단백질 10 (IP-10)을 포함한 케모카인, 인터류킨 1 베타 (IL-1β), 인터류킨 2 (IL-2), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 5 (IL-5), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 7 (IL-7), 인터류킨 8 (IL-8), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 10 (IL-10), 인터류킨 12 (IL-12), 인터류킨 13 (IL-13), 인터류킨 15 (IL-15), 인터류킨 17 (IL-17), 인터류킨 18 (IL-18), 인터류킨 21 (IL-21), 인터류킨 22 (IL-22), 인터류킨 23 (IL-23), 인터류킨 27 (IL-27), 인터류킨 31 (IL-31)을 포함한 인터류킨, 인터페론 알파 (INFα)를 포함한 인터페론, 림포카인, 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 줄기 세포 인자 (KL), 종양 괴사 인자 알파 (TNF-α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 신경 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 섬유모세포 성장 인자 2 (FGF-2), 표피 성장 인자 (EGF), 각질세포 성장 인자, 형질전환 성장 인자 (TGF), 인슐린-유사 성장 인자, 데스(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 뇌-유래 신경영양 인자 (BDNF), 에오탁신, CXC 리간드 1 (GROα), 인터류킨 1 수용체 길항제 (IL-1RA), 인터류킨 1 알파 (IL-1α), 백혈병 억제 인자 (LIF), 태반 성장 인자 (PLGF), 케모카인 리간드 5 (RANTES), 줄기 세포 인자 (SCF), 간질 세포 유래 인자 (SDF1α) 및 종양 괴사 인자 (TNFβ).

[0083] 일부 실시양태에서는, DMSO가 가질 수 있는 임의의 잠재적인 유해 효과를 방지하기 위하여, 어떠한 단계에서도 디메틸 술폭시드 (DMSO)가 조성물에 첨가되지 않음으로써, 조성물이 실질적으로 무-DMSO로 유지된다. 조합된 조성물은 이후 예를 들면 초-저온 냉동기 중 극저온 바이알에서 극저온으로 저장될 수 있다. 상기 극저온 저장은 -60 ℃ 미만 또는 -80 ℃ 미만의 온도로 조절될 수 있다.

[0084] 도 26a-28b는 의료 치료 방법에서 사용중인 본원에서 기술되는 실시양태를 포함하는 조성물을 도시한다. 도 26a-26c는 본원에서 기술되는 실시양태의 조성물을 사용하는 척추 유합술 시술을 도시한다. 환자의 척추 (52)는 유합되어야 할 2개의 인접 추골 (54), (56)을 포함하고 있다. 비제한적으로 하기를 포함한 수많은 다양한 병들을 치료하는 데에 있어서, 2개 이상의 추골을 유합하는 것이 바람직할 수 있다: 척추측만증(scoliosis), 척추전위증(spondylolisthesis), 과다후만증(hyperkyphosis), 과다전만증(hyperlordosis) (또는 과소전만증(hypolordosis)/편평 등 증후군, 과소척추후만증(hypokyphosis)), 퇴행성 디스크 질환 (DDD), 척추협착증, 추골 골절을 포함한 외상, 종양, 교정 수술, 감염, 가성 관절증, 탈출성 디스크, 척추분리증, 기계적 불안정성, 후관절 증후군, 만성 등 통증 및 다리 방산통. 도 26a에서, 환자의 추골 (54), (56)은 적어도 부분적으로 노출되며, 추골간 디스크 (58)는 제거된다. 일부 경우에서, 디스크 (58)는 이미 제거되어 있을 수 있거나, 또는 빠

지거나 손상되어 있어서 제거를 필요로 하지 않을 수 있다. 일부 경우에서는, 디스크 중 적어도 일부가 고의적으로 제자리에 남게 될 수도 있다. 일부 경우에서 그것이 선택사항이기는 하지만, 도 26b에서는, 하중-지지 장치 (60)가 제1 추골 (54)와 제2 추골 (56) 사이에 위치된다. 상기 하중-지지 장치 (60)는 유합 케이지 또는 체간 장치를 포함할 수 있다. 도 26c에서는, 생물학적 조성물 (62), 예컨대 본원에서 기술되는 것들 중 어느 실시양태가 추골 (54), (56) 사이에, 그리고 적용가능할 경우 조금이라도 있을 수 있는 체간 장치의 임의의 공강 내를 포함하여 하중-지지 장치 (60) 주변으로 또는 그에 인접하여 위치된다. 생물학적 조성물 (62)은 후-측구 (posterior-lateral gutter) 또는 그 부근에 위치될 수도 있다. 시술은 후방 요추 체간 유합 (PLIF), 추간공 (transforaminal) 요추 체간 유합 (TLIF), 전방 요추 체간 유합 (ALIF), 극측(extreme lateral) 체간 유합 (XLIF), 직측(direct lateral) 체간 유합 (DLIF) 또는 축상 요추 체간 유합 (AliaLIF)을 포함할 수 있다. 적절한 양의 생물학적 조성물 (62)은 그것이 2개 추골 (54), (56)의 유합을 돕는 데에 효과적이 되도록 위치된다. 일부 경우에서, 환자는 골격 성숙할 수 있다. 다른 경우에서, 환자는 골격상 미성숙할 수 있다.

[0085] 일부 경우에서, 제2 추골 (56)에 대한 제1 추골 (54)의 유합을 촉진하거나, 돕거나 또는 가속하기 위한 생물학적 조성물 (62)의 유효량은 충전될 부피의 약 1 % 내지 50 % 또는 약 3 % 내지 25 % 또는 약 5 % 내지 20 % 또는 약 10 %를 구성할 수 있다. 충전될 부피 중 나머지는 골 이식편 또는 다른 재료로 충전될 수 있거나, 또는 적어도 부분적으로 충전되지 않고 유지될 수 있다. 예를 들면, 약 10 ml, 약 0.5 ml 내지 2.0 ml의 디스크 공간에 생물학적 조성물 (62)이 삽입될 수 있거나, 또는 약 5 ml, 약 0.25 ml 내지 약 1.0 ml의 디스크 공간에 생물학적 조성물 (62)이 삽입될 수 있다. 생물학적 조성물 (62)은 실질적으로 충전될 부피 내의 특정 위치에 적용될 수 있거나, 또는 대안적으로는 충전될 부피 내의 산재된 위치에 적용될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 합성 골 치환체, 예컨대 베타 트리칼슘 포스페이트 또는 마쇄된 골을 포함한 실제 골편을 포함한 다른 재료가 생물학적 조성물 (62)에 첨가될 수 있다.

[0086] 도 27a-27b는 본원에서 기술되는 실시양태의 조성물을 사용한 유합 시술을 도시한다. 환자 골격계의 분절 (72)은 융합되어야 할 제1 골 부분 (74) 및 제2 골 부분 (76)을 포함한다. 비제한적으로 하기를 포함한 수많은 다양한 병을 치료하는 데에 있어서, 2개 이상의 골 부분을 유합하는 것이 바람직할 수 있다: 골절을 포함한 외상, 종양, 관절염, 강직증, 변형, 선천성 결함, 골 길이 불일치, 교정 수술, 감염, 골괴사, 골다공증, 가성관절증, 불-유합, 지연-유합 및 통증. 골 부분 (74), (76)은 둘 다 척추의 특정 부분 (경부, 흉부, 요추, 천골) 내에 있을 수 있거나, 또는 2개의 서로 다른 부분 (경부 내지 요추, 요추 내지 천골 등) 내에 있을 수 있다. 도 27a에서, 제1 골 부분 (74) 및 제2 골 부분 (76)은 적어도 부분적으로 노출된다. 다음에, 예를 들면 절단 (절골술) 또는 조질화(roughening)에 의해 제1 및 제2 골 부분 (74), (76) 중 하나 또는 각각의 표면이 준비될 수 있다. 일부 경우에서는, 제1 골 부분 (74) 및 제2 골 부분 (76)을 서로에 대하여 고정하기 위하여, 판, 막대, 네일(nail), 스크류, 후크 또는 핀과 같은 하중-지지 장치 (75)가 사용될 수 있다. 도 27b에서는, 생물학적 조성물 (78), 예컨대 본원에서 기술되는 것들 중 어느 실시양태가 제1 및 제2 골 부분 (74), (76) 사이에, 그리고 적용가능할 경우 하중-지지 장치 (75) 주변으로 또는 그에 인접하여 위치된다. 적절한 양의 생물학적 조성물 (78)은 그것이 제1 및 제2 골 부분 (74), (76)의 유합을 돕는 데에 효과적이 되도록 위치된다. 골격계의 어떠한 골도 생물학적 조성물 (78)을 이용하여 유합될 수 있다. 일부 경우에서, 환자는 골격 성숙할 수 있다. 다른 경우에서, 환자는 골격상 미성숙할 수 있다.

[0087] 일부 경우에서, 제2 골 부분 (76)에 대한 제1 골 부분 (74)의 유합을 촉진하거나, 돕거나 또는 가속하기 위한 생물학적 조성물 (78)의 유효량은 충전될 부피의 약 1 % 내지 50 % 또는 약 3 % 내지 25 % 또는 약 5 % 내지 20 % 또는 약 10 %를 구성할 수 있다. 충전될 부피 중 나머지는 골 이식편 또는 다른 재료로 충전될 수 있거나, 또는 적어도 부분적으로 충전되지 않고 유지될 수 있다. 생물학적 조성물 (78)은 실질적으로 충전될 부피 내의 특정 위치에 적용될 수 있거나, 또는 대안적으로는 충전될 부피 내의 산재된 위치에 적용될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 합성 골 치환체, 예컨대 베타 트리칼슘 포스페이트 또는 마쇄된 골을 포함한 실제 골편을 포함한 다른 재료가 생물학적 조성물 (78)에 첨가될 수 있다.

[0088] 도 28a-28b는 환자의 영역 (82)에서의 연조직 (84)의 치유 또는 성장 증대를 위한 시술을 도시한다. 본원에서 기술되는 것들 중 어느 실시양태와 같은 생물학적 조성물 (86)은 연조직 (84) 내에, 부근에, 또는 그에 인접하여 위치된다. 대안적인 시술에서는, 더하여 또는 대신하여, 부분적으로 또는 완전히 경질인 조직이 생물학적 조성물 (86)에 의해 치료될 수 있다. 일부 경우에서, 치료될 환자는 적어도 약간의 암성 세포를 가지고 있으며, 생물학적 조성물 (86)은 그 암성 세포 내에, 부근에, 또는 그에 인접하여 위치된다. 일부 경우에서, 치료될 환자는 적어도 약간의 암성 세포가 제거되어 있으며, 생물학적 조성물 (86)은 암성 세포의 이전의 위치 (이전 부위) 내에, 부근에, 또는 그에 인접하여 위치된다. 암 환자 또는 암-후 환자에서, 암에는 비제한적으로

하기가 포함될 수 있다: 림프관 종양을 포함한 림프 암, 연조직 육종, 지방 조직 종양, 근육 조직 종양, 말초 신경 종양, 섬유 조직 종양, 관절 조직 종양 및 혈관 종양. 일부 경우에서, 생물학적 조성물은 혈관 재구성(예컨대 혈관)에 사용될 수 있다. 치료되는 환자에는 성인 또는 소아 환자가 포함될 수 있다. 일부 경우에서, 연조직 (84)의 치유 또는 성장 증대를 촉진하기 위한 생물학적 조성물 (86)의 유효량은 적어도 약 0.25 ml, 또는 약 0.25 ml 내지 약 5 ml 또는 약 0.25 ml 내지 약 2 ml를 포함할 수 있다.

[0089] 비제한적으로 양수, 말초 혈액, 제대 조직, 골수, 지방 조직 및 중추신경계 (CNS) 액을 포함하여, 제대혈을 제외한 다른 공급원이 본원에서 기술되는 조성물용으로 가능하다.

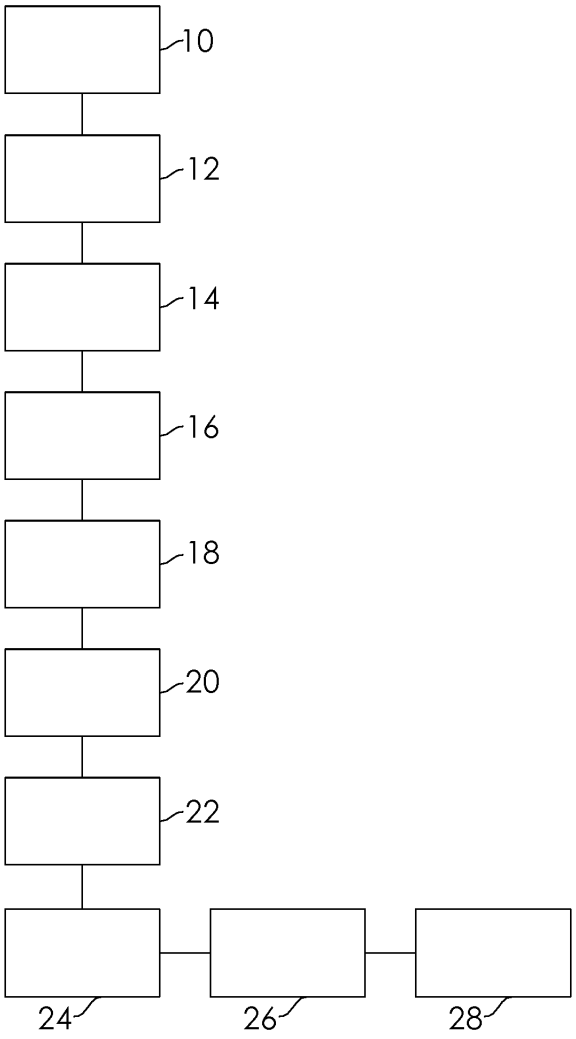
[0090] 전기에 언급된 시술들 이외에도, 비제한적으로 당뇨병 및/또는 그의 관련 증상의 치료를 위한 시술, 당뇨병성 신경병증의 치료를 위한 시술, 당뇨병성 궤양의 치료를 위한 시술, 표피, 진피 또는 피-하 당뇨병성 궤양의 치료를 위한 시술, 만성 통증을 갖는 관절을 포함한 관절의 통증 관리를 위한 시술, 건염의 치료를 위한 시술, 찢어진 연골의 치료를 위한 시술, 비제한적으로 어깨 관절, 발목 관절, 무릎 관절, 엉덩이 관절 및 팔꿈치 관절을 포함한 관절에서의 건 이완과 같은 건 이완의 치료를 위한 시술, 백혈병의 치료를 위한 시술, 림프종의 치료를 위한 시술, 골수종의 치료를 위한 시술, 기타 암의 치료를 위한 시술, 기타 표피, 진피 또는 피-하 장애 또는 질병을 위한 시술, 또는 파킨슨병 및 뇌 종양을 포함한 뉴런 손상과 관련된 시술을 포함하여, 본원에서 기술되는 실시양태들의 조성물 및 제조 방법을 포함하는 다른 시술들이 수행될 수 있다. 종양 크기를 감소시키기 위하여 본원에서 기술되는 실시양태의 조성물 및 제조 방법을 포함하는 시술들이 수행될 수도 있다. 일부 실시양태에서는, 경막외 적용, 수막강 경유 적용, 정맥내 (IV) 적용 또는 집접 부위 적용을 포함한 다른 방식으로 조성물이 첨가될 수도 있다.

[0091] 실시양태들을 나타내어 기술하기는 하였지만, 본원에서 개시되는 본 발명 개념의 영역에서 벗어나지 않고도 다양한 변형들이 이루어질 수 있다.

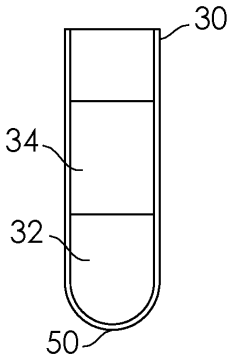
[0092] 본원에서 개시되는 범위는 임의의 모든 중복, 하위-범위 및 이들의 조합도 포괄한다. "이하", "적어도", "초과", "미만", "사이" 등과 같은 용어들은 언급된 숫자를 포함한다. "대략", "약" 및 "실질적으로"와 같은 용어가 선행하는 숫자는 본원에서 사용될 때 언급된 숫자를 포함하는 것으로써 (예컨대 약 10 % = 10 %), 여전히 원하는 기능을 수행하거나 원하는 결과를 달성하는 언급된 양에 가까운 양도 나타내는 것이다. 예를 들면, "대략", "약" 및 "실질적으로"이라는 용어는 언급된 양의 10 % 미만 이내, 5 % 미만 이내, 1 % 미만 이내, 0.1 % 미만 이내 및 0.01 % 미만 이내인 양을 지칭할 수 있다.

도면

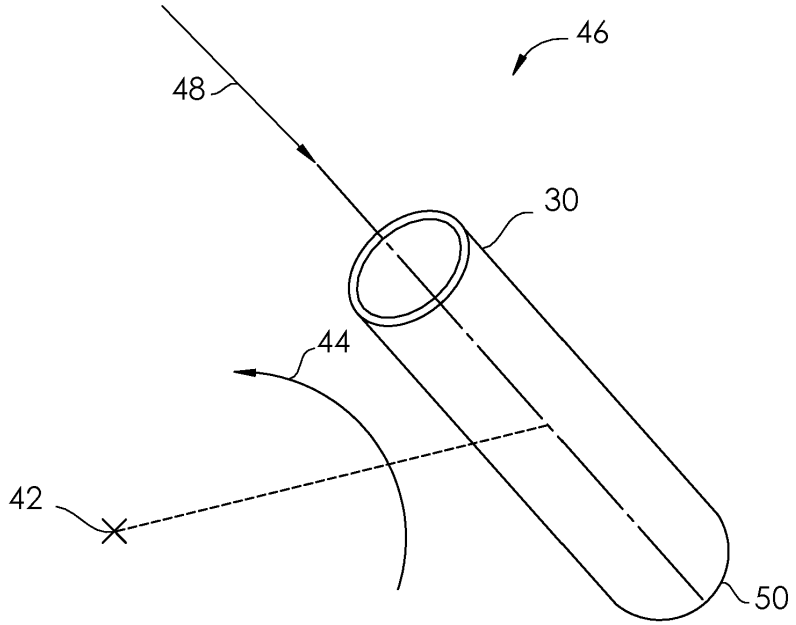
도면1



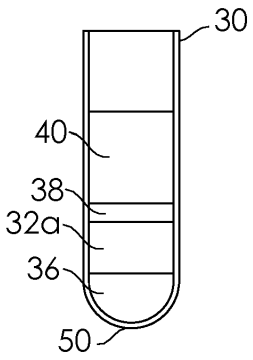
도면2



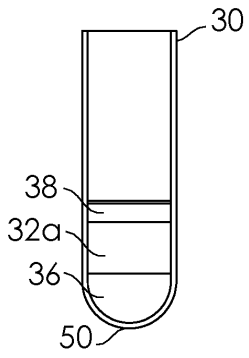
도면3



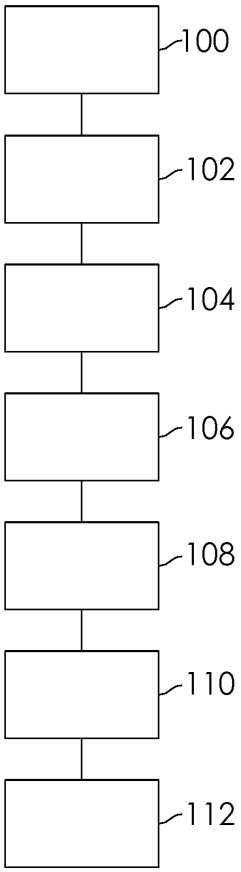
도면4



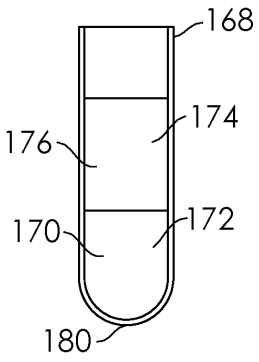
도면5



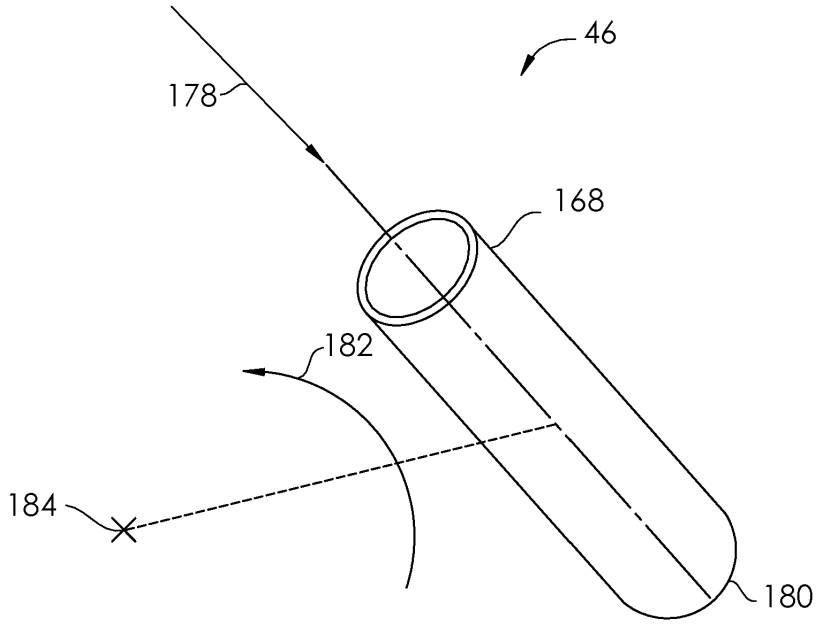
도면6



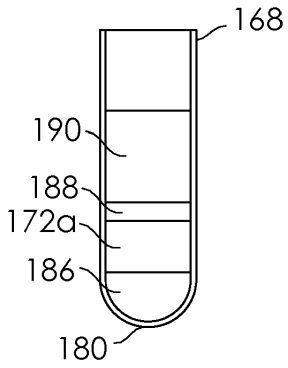
도면7



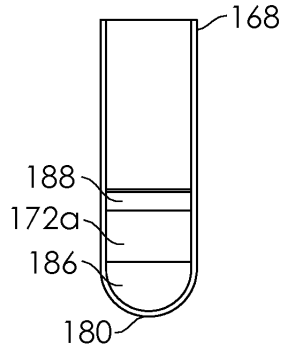
도면8


46
178
168
182
184
180

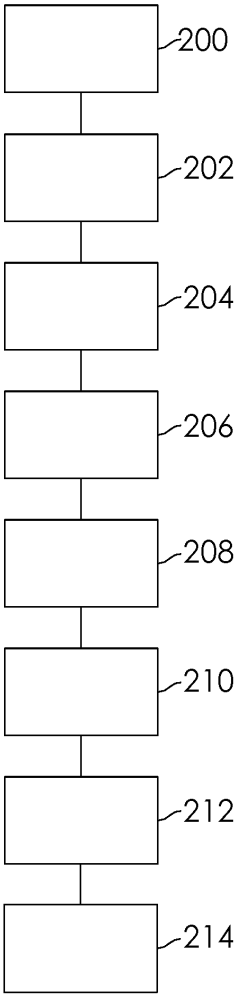
도면9


168
190
188
172a
186
180

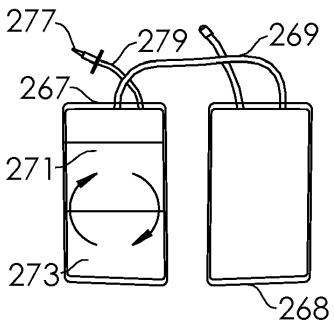
도면10


168
188
172a
186
180

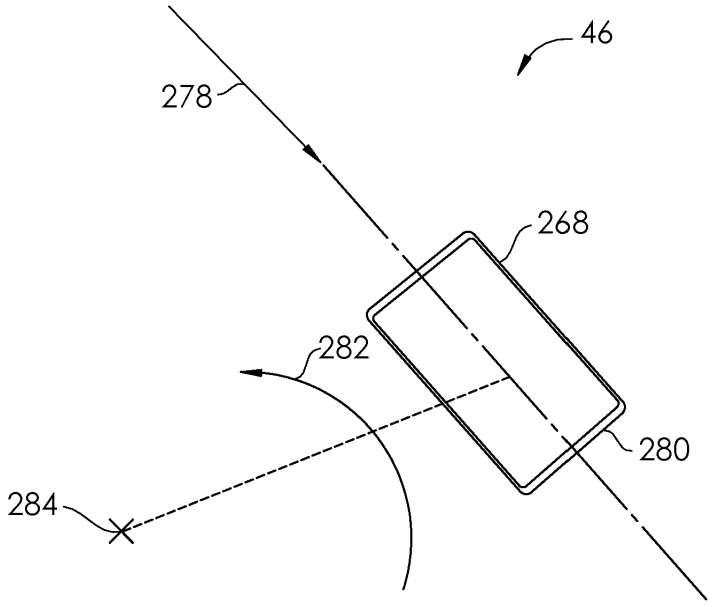
도면11



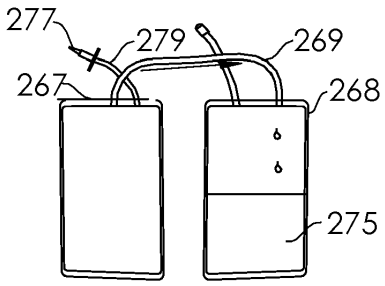
도면12



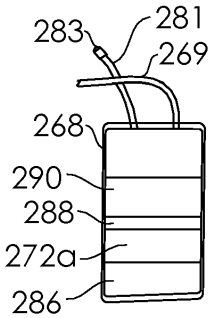
도면13



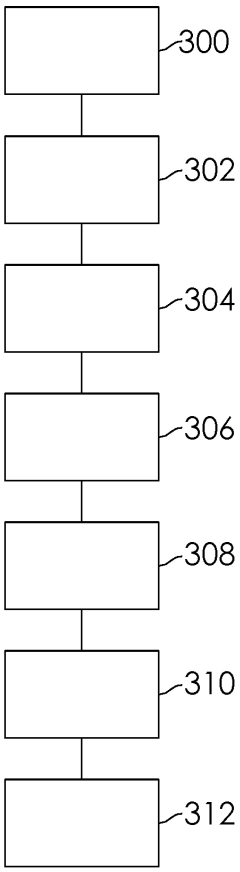
도면14



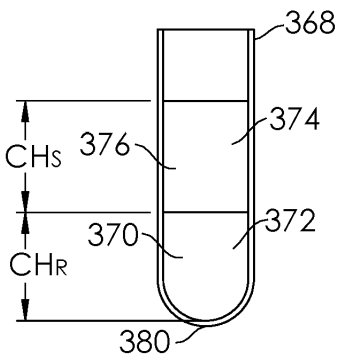
도면15



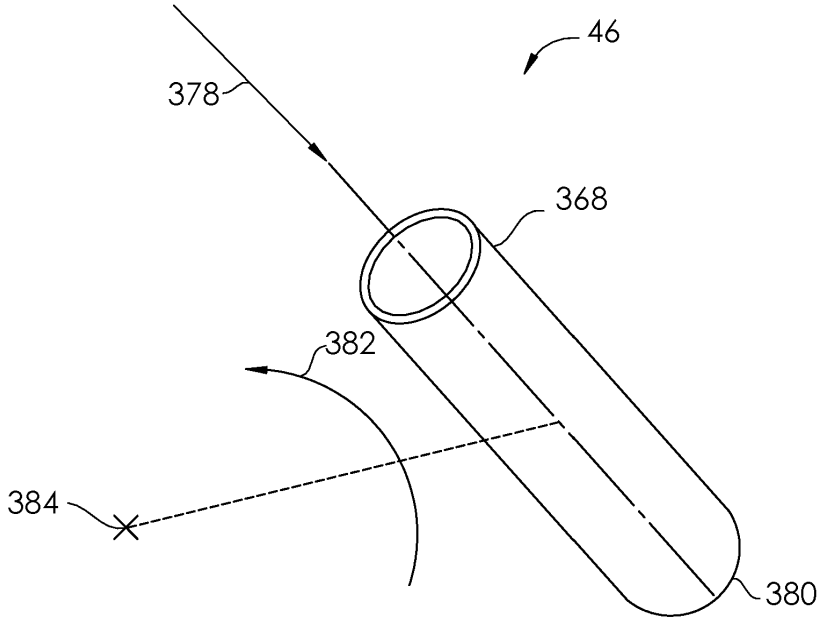
도면16



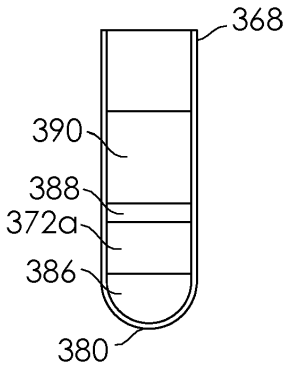
도면17



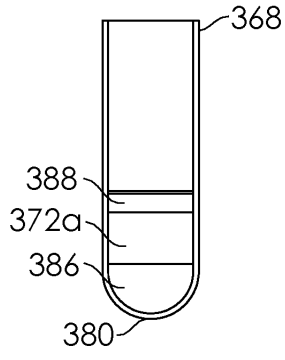
도면18



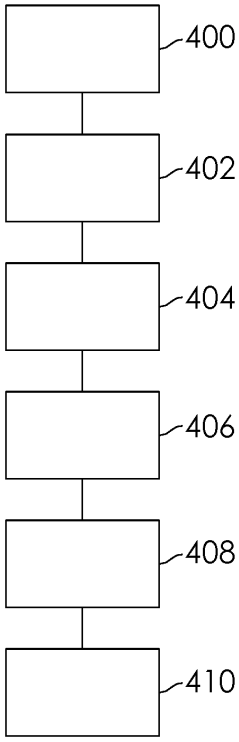
도면19



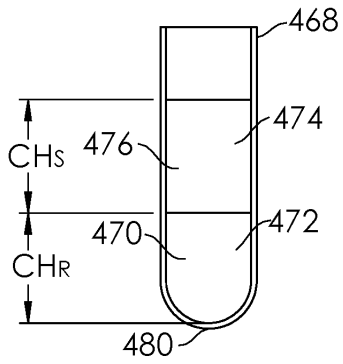
도면20



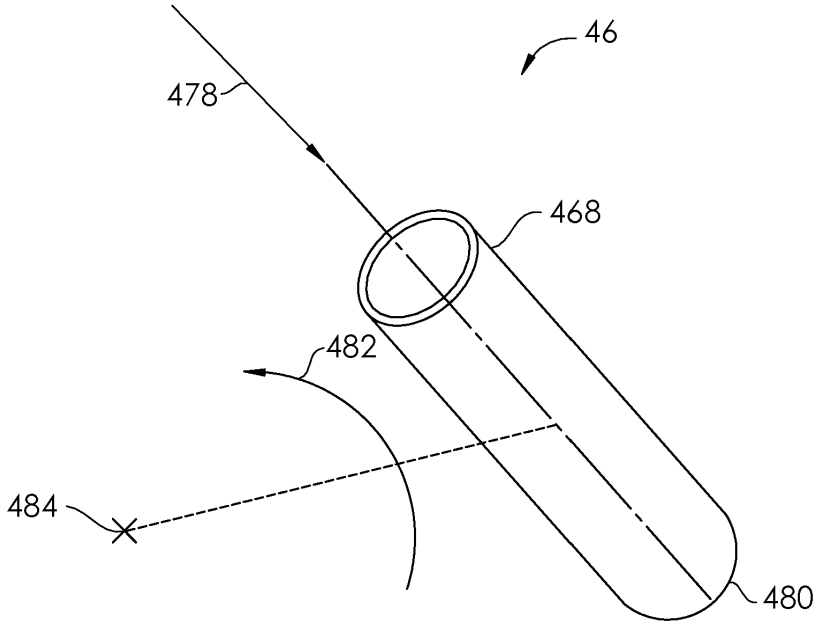
도면21



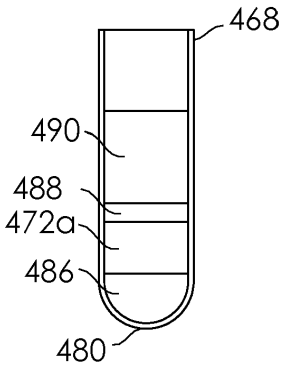
도면22



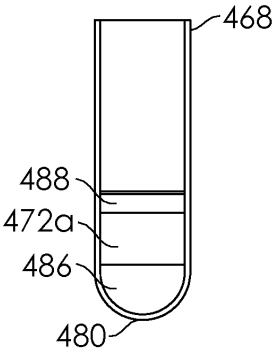
도면23



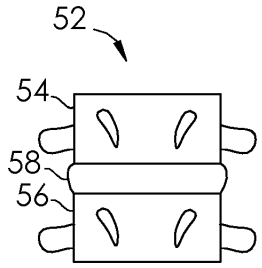
도면24



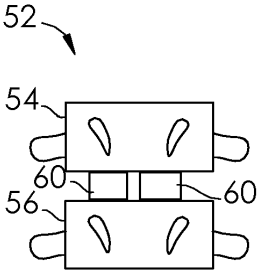
도면25



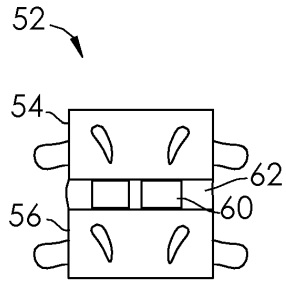
도면26a



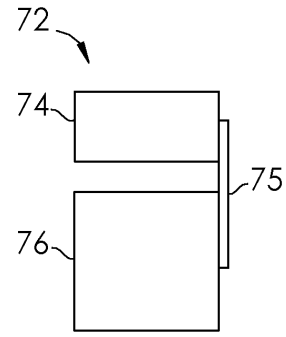
도면26b



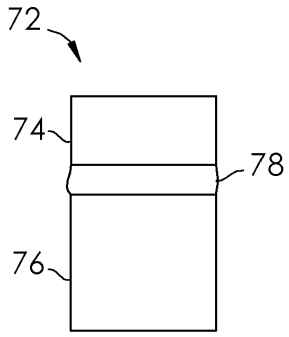
도면26c



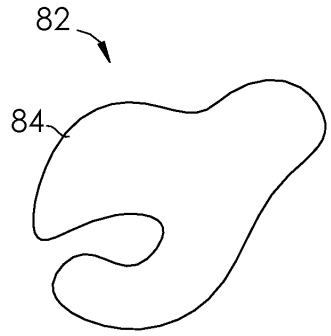
도면27a



도면27b



도면28a



도면28b

