



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년03월28일
(11) 등록번호 10-1720808
(24) 등록일자 2017년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61M 1/34 (2006.01) A61M 1/02 (2006.01)
A61M 1/36 (2006.01) B01D 36/04 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01) G01N 33/80 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7012466
(22) 출원일자(국제) 2009년11월24일
심사청구일자 2014년10월21일
(85) 번역문제출일자 2011년05월31일
(65) 공개번호 10-2011-0090995
(43) 공개일자 2011년08월10일
(86) 국제출원번호 PCT/SE2009/051327
(87) 국제공개번호 WO 2010/064973
국제공개일자 2010년06월10일
(30) 우선권주장
12/325,672 2008년12월01일 미국(US)
12/333,926 2008년12월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US06444471 B1
US20030134416 A1

(73) 특허권자
제너럴 일렉트릭 캄파니
미합중국 뉴욕 (우편번호 12345) 웨넥테디 원 리
버 로우드
(72) 발명자
밀러 피터
미국 06320 코네티컷주 뉴 런던 스타 스트리트 31
폴리조티 브라이언 디.
미국 02130 메사추세츠주 자메이카 플레인 오차드
힐 로드 45
(74) 대리인
양영준, 안국찬

전체 청구항 수 : 총 19 항

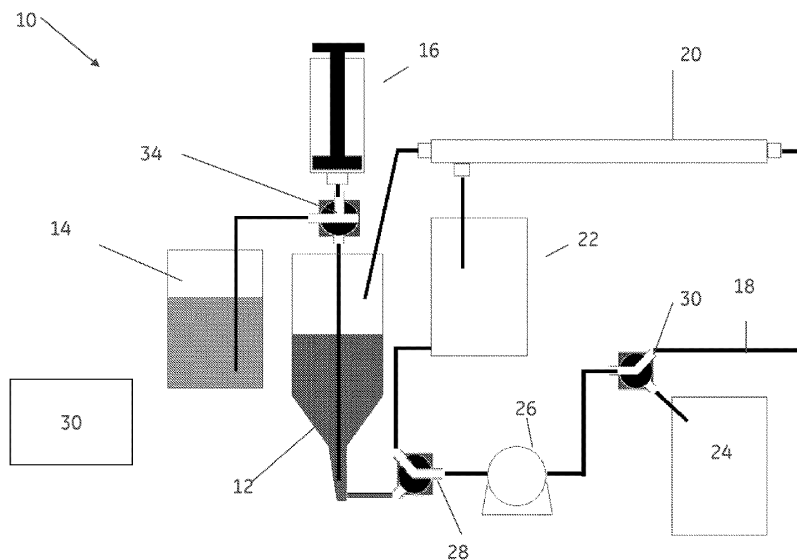
심사관 : 최석규

(54) 발명의 명칭 세포를 체액으로부터 분리하기 위한 시스템 및 방법

(57) 요약

본 발명의 생물학적 재료를 처리하기 위한 방법 및 시스템은 용기에 생물학적 재료를 포함하고; 용기 내의 재료에 응집 작용제를 추가하고 재료가 2개 이상의 특정 부재료로 분리되게 하고; 부재료 중 하나 이상을 용기로부터 추출하고; 용기에 남아 있는 부재료 중 하나 이상을 여과 장치로 자동적으로 이송하고; 얻어진 타겟 보유물(retentate)을 타겟 보유물 리셉터클 내로 수집한다.

대표도



(72) 발명자

스미스 레지널드 디.

미국 12309 뉴욕주 니스카유나 1 리서치 서클 지이
글로벌 리서치

수드 안업

미국 12309 뉴욕주 니스카유나 케이1 4디55 1 리서
치 서클 지이 글로벌 리서치

우드 니콜 엘.

미국 12309-1027 뉴욕주 니스카유나 케이1-5디55
원 리서치 서클 글로벌 리서치 센터

유 리밍

미국 08855 뉴저지주 피스카타웨이 센텐니얼 애비
뉴 800 지이 헬스케어 바이오-사이언시스 코포레이
션

조우 홍이

미국 12309 뉴욕주 니스카유나 원 리서치 서클 씨
이비 2532

명세서

청구범위

청구항 1

적혈구 세포 및 유핵 세포를 포함하는 생물학적 재료를 처리하기 위한 유체 유동 경로를 갖는 시스템이며,

상기 생물학적 재료를 내장하고 생물학적 재료가 2개 이상의 별개의 부재료 층으로 분리될 수 있게 하기 위한 용기로서, 별개의 부재료 층 중 하나는 적혈구 세포의 층을 포함하는, 용기와;

상기 용기로부터 적혈구 세포의 층을 제거하도록 구성되고, 적혈구 세포의 층이 조작 중에 침하하는 레벨에서 용기 내에 위치하는 말단부를 갖는 픽 업 라인을 포함하는, 추출 장치와;

상기 추출 장치로부터 유체 유동 경로를 따라 하류에 위치하고, 남아 있는 부재료로부터 유핵 세포를 분리하는, 여과 장치와;

상기 용기와 여과 장치 사이에 위치하는 밸브와;

하나 이상의 부재료를 용기와 여과 장치 사이에서 이송시키는 도관과;

상기 추출 장치를 자동적으로 개시하여 용기로부터 적혈구 세포의 층을 제거하고, 적혈구 세포의 제거 후에 밸브를 자동적으로 개방하여 유체 유동 경로를 따라 더 하류의 용기 내에 남아 있는 하나 이상의 부재료를 도관을 통해 여과 장치로 이송하도록 구성되는 제어 장치를 포함하는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

하나 이상의 여과물을 적어도 일시적으로 저장하기 위한 하나 이상의 리셉터클을 더 포함하는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 리셉터클 중 하나는 폐기 여과물 리셉터클인

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 리셉터클 중 하나는 타겟 보유물 리셉터클인

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 도관과 유체 연통하여, 하나 이상의 부재료가 상기 용기와 상기 여과 장치 사이에서 이송되는 것을 용이하게 하는 펌프를 더 포함하는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 6

제5항에 있어서,

타겟 보유물을 적어도 임시로 저장하는 리셉터클을 더 포함하는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서,
폐기 여과물을 적어도 임시로 저장하는 저장하는 리셉터클을 더 포함하는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 도관을 따라 타겟 보유물을 타겟 보유물 리셉터클 내로 선택적으로 유도하는 밸브를 더 포함하는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 9

제7항에 있어서,
상기 도관을 따라 폐기 여과물을 적어도 부분적으로 도관을 통해 선택적으로 재순환하는 밸브를 더 포함하는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 용기는 2개 이상의 부재료의 상대적인 중량에 적어도 부분적으로 기초하여 생물학적 재료를 부재료로 분리
하도록 구성되는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 11

제10항에 있어서,
상기 용기는 부재료를 침강 층으로 분리하도록 구성되는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 추출 장치는 하나 이상의 침강 층을 인출하도록 구성되는
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 13

제1항에 있어서,
상기 추출 장치는 용기 내의 최하부층을 인출하도록 구성되고, 최하부층은 적혈구 세포인
생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 14

제12항에 있어서,
상기 추출 장치는 용기 내의 최상부층을 인출하도록 구성되는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 15

제1항에 있어서,

작용제 리셉터클과 유체 연통하여, 작용제 리셉터클로부터 결정된 양의 작용제를 선택적으로 제거하고, 결정된 양의 작용제를 용기 내로 유도하는, 밸브를 더 포함하는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 추출 장치는 또한 작용제가 이전에 도입된 용기로부터 결정된 양의 재료를 인출하고, 그 다음에 인출된 재료를 용기 내로 다시 복귀시켜, 재료가 작용제와 혼합되는 것을 용이하도록 구성되는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 용기 내의 적혈구 세포의 레벨을 결정하는 감지 장치를 더 포함하는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 용기와 여과 장치 간의 하나 이상의 부재료의 이송은 자동화되는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 용기 내의 하나 이상의 부재료의 존재를 결정하는 센서를 더 포함하는

생물학적 재료를 처리하기 위한 시스템.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 복합 생물학적 재료를 부성분으로 처리하기 위한 시스템, 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전체 혈액으로부터의 적혈구(RBC)의 분리는 일반적으로 백혈구 또는 줄기 세포와 같은 덜 풍부한 세포의 분석 또는 치료 사용 전에 요구된다. 많은 종래의 혈구 분리 절차는 예비적 적혈구 제거(depletion) 및 샘플 체적 감소를 요구한다. 이들은 재생 의약품 용례 및 장기 세포 보관(cell banking)을 위해 공통적으로 요구되는 처리 단계인데, 이 경우 직접 이식하는데 필요한 저장 한계 및/또는 작은 체적 요구조건에 기인한 감소된 체적에서 희귀 세포의 최대 수득률이 요구된다. 오늘날, 혈구 함유 샘플(예컨대 제대 혈액, 골수, 말초 혈액)을 처리하기 위한 대부분의 공통 기술은 분리를 개선하기 위해 밀도-구배 매체를 사용하거나 사용하지 않으면서 원심 분리를 이용하는 밀도-구배 침강(sedimentation)을 필요로 한다. 자동화된 원심 분리 시스템은 높은 산출량 샘플 처리에 대한 증가하는 요구를 충족하기 위해 제대 혈액 및 골수 샘플의 폐쇄된 시스템 처리를 위해 최근에 개발되었다. 수동 기술에 비해 산출량을 크게 향상시키지만, 원심 분리 기반 장치는 원심 분리 버킷(centrifuge bucket)의 중량 및 고정된 물리적 치수 때문에 가요성 및 휴대성을 제한하였다.

[0003] 다수의 혈구 분리 용례에 또한 여과 기술이 사용된다. 예컨대, 침층 여과(depth filtration)는 (예컨대 수혈을

위해) 전체 혈액으로부터 백혈구의 제거를 달성하는데 때때로 사용되었다. 그러나 이들 필터는 [필터 내의 세포의 포집(trapping)을 통한] 최대 백혈구 제거를 위해 설계되고, 여과 단계 후 높은 세포 회수를 위해 설계되지 않았다. 더욱이, 멤브레인 기반 혈장 분리 반출술(plasmapheresis)은 전체 혈액으로부터 혈장(plasma)을 제거하고 처리하기 위한 일반적인 기술이다. 그러나, 이 기술은 여과 전에 적혈구(RBC)의 전체 혈액의 사전-제거를 수반하지 않고, 혈구 보관 용례에 요구되는 체적 감소 유형을 달성하지 않는다.

[0004] 또한 중력 또는 원심 분리를 통한 침강 방법은 혈액의 다양한 성분들을 분리하기 위한 것으로 당해 분야에서 알려져 있다. 전체 혈액으로부터 RBC의 침강을 용이하게 하기 위한 한가지 방법으로는 RBC를 위한 응집 작용제로 알려져 있는 덱스트란(dextran), 헤타스타치(hetastarch) 또는 젤라틴(gelatin)과 같은 중합 큰 분자를 이용하는 것이 있다. 혈액 내의 응집 작용제의 조성 및 화학량론 비에 따라서, RBC 침강 공정의 속도 및 유효성이 다양하게 변할 수 있다. 포타슘 옥살레이트(potassium oxalate)와 포타슘 말로네이트(potassium malonate)와 같은 침강-증강 작용제의 일부가 알려져 있다. 이러한 침강-증강 작용제의 유효성은 혈액 샘플에 대한 작용제의 농도에 의해 주로 결정된다. 포타슘 옥살레이트 및 말로네이트가 효과적인 RBC 침강 증강 작용제로서 이전에 증명되었을지라도, 이러한 작용제의 임상적 효용은 포타슘 염(potassium salt)과 관련된 잠재적 심혈관(cardiovascular) 독성에 의해 제한된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 하류 세포 치료 적용을 위해 (줄기 세포와 같은) 높은 타겟 세포 회수 및 생존율(viability)을 달성 하면서, 전체 혈액과 같은 생물학적 재료를 처리하기 위한 기능적으로 폐쇄된 시스템, 높은 산출량 시스템 및 방법에 대한 필요성을 다루도록 구성된다. 여과는 혈액 투석 및 혈장 분리 반출술을 포함하는 혈액 처리 용례를 위해 공통으로 사용되는 기술이지만, 이전에는 집중된 백혈구 세포(WBC) 샘플을 얻기 위해 적혈구 및 잉여 혈장을 제거하기 위해 전체 혈액과 같은 생물학적 재료를 처리할 필요가 있는 혈구 보관 용례에 사용되지 않았다. 이는 유사한 사이즈의 덜 풍부한 백혈구와 훨씬 덜 풍부한 줄기 세포로부터 풍부한 적혈구를 분리하는 것과 관련되는 난제이기 때문이다. 시스템 및 방법의 실시예들 중 하나는 벌크 적혈구 제거를 위한 초기 RBC 응집 및 중력 침강 단계와, 잉여 혈장의 제거 및 세포 농축(concentration)을 위한 후속되는 여과 단계를 포함하는 2단계 공정을 포함한다.

[0006] 생물학적 재료를 처리하기 위한 폐쇄 시스템의 일 실시예는, 생물학적 재료를 내장하고 생물학적 재료가 2개 이상의 특정 부재료로 분리될 수 있게 하기 위한 용기와; 부재료들 중 적어도 하나를 용기로부터 제거하기 위한 추출 장치와; 여과 장치와; 용기와 여과 장치 사이에 하나 이상의 부재료를 이송시키는 도관과; 용기와 여과 장치 사이에 부재료들 중 하나 이상을 이송하기 위한 제어 장치를 포함한다. 시스템은 하나 이상의 여과물(filtrate)을 적어도 일시적으로 저장하기 위한 하나 이상의 리셉터클을 포함할 수 있으며, 여기에서 리셉터클들 중 적어도 하나는 폐기 여과물 리셉터클이고 리셉터클들 중 적어도 하나는 타겟 보유물 리셉터클이다. 시스템은 타겟 보유물을 타겟 보유물 리셉터클 내로 선택적으로 유도하기 위한, 도관을 따른 밸브와; 도관을 통하여 적어도 부분적으로 폐기 여과물을 선택적으로 재순환시키기 위한, 도관을 따른 밸브를 더 포함한다. 도관과 유체 연통하는 펌프는 하나 이상의 부재료가 용기와 여과 장치 사이에서 이송되는 것을 용이하게 하기 위해 시스템에 또한 통합될 수 있다.

[0007] 시스템의 용기는 2개 이상의 부재료의 상대적인 중량을 기초로 하여 적어도 부분적으로 재료를 부재료로 분리하도록 구성될 수 있다. 부재료는 침강 층들로 분리될 수 있고, 여기에서 추출 장치는 침강 층들 중 하나 이상을 인출하거나 달리 추출하도록 구성된다. 일 실시예에서, 추출 장치는 용기 내의 최하부층을 인출하도록 구성되고, 또 다른 실시예에서 추출 장치는 대안적으로 또는 부가적으로, 최하부와 최상부 사이에 있는 하나 이상의 층 또는 용기 내의 최상부층을 인출할 수 있다.

[0008] 시스템은 결정된 양의 작용제를 작용제 리셉터클로부터 선택적으로 제거하고 결정된 양의 작용제를 용기 내로 도입하기 위해, 작용제 리셉터클과 유체 연통하는 밸브를 더 포함할 수 있다. 이 예에서의 추출 장치는 작용제가 이전에 도입되었던 용기로부터 추출 장치 내로 결정된 양의 재료를 인출하고 이후 인출된 재료를 용기 내로 다시 복귀시켜서, 재료가 작용제와 혼합되는 것을 용이하게 한다. 시스템은 용기 내에서 부재료들 중 적어도 하나의 위치 또는 레벨을 결정하기 위한 감지 장치를 더 포함할 수 있다.

[0009] 용기와 여과 장치 사이에서의 부재료들 중 하나 이상의 이송과 같은 시스템의 일부 또는 전체 시스템은 자동화

될 수 있다.

- [0010] 생물학적 재료를 처리하기 위한 방법의 예는 용기에 생물학적 재료를 제공하는 것과; 응집 작용제를 용기 내의 재료에 첨가하고 재료가 2개 이상의 특정 부재료로 분리되게 하는 것과; 부재료들 중의 하나 이상을 용기로부터 추출하는 것과; 용기 내에 남아 있는 부재료들 중 하나 이상을 도관을 통해 여과 장치로 자동적으로 이송하는 것과; 얻어진 타겟 보유물을 타겟 리셉터클 내로 유도하는 것을 일반적으로 포함한다.
- [0011] 방법의 한가지 예는 예컨대 샘플 체적을 감소시키고 유핵 세포(nucleated cell)의 높은 회수 및 유핵 세포의 생존율을 달성하고 개시 샘플에 존재하는 적혈구의 대부분을 제거하기 위해, 후속적인 저온보존(cryopreservation) 및/또는 직접적 치료 적용을 위해 혈액 샘플을 처리하는 것을 포함한다.
- [0012] 방법의 한가지 예는 만능 줄기 세포를 포함하는 백혈구 세포(WBC) 분획물(fraction)을, 전체 제대 혈액, 골수 또는 (GCSF 자극된 말초혈액을 포함하는) 말초 혈액으로부터 분리시킬 수 있는 것이다. 본 발명의 예시 방법 중 적어도 하나는, 사용된 필터 카트리지와 여과 시간 조정에 기초하여 넓은 범위의 개시 체적 및 샘플 유형을 취급하는데 유연성을 제공하면서, 높은 백혈구 회수(>80%), >95% CD34 회수, 및 높은 백혈구 생존율(>95%)을 달성할 수 있다.
- [0013] 현재 방법과는 달리, 본 발명의 방법 및 시스템은 사용자가 개별 원심 분리기를 구입하고 사용할 것을 요구하지 않으면서 복합 체액의 자동화된 처리 공정을 가능하게 한다. 본 발명의 방법과 시스템은, 개시 체적의 범위를 취급하고 사용자가 지정한 최종 체적으로 샘플을 결집시키기(concentrate) 위해, 그리고 다중화 공정들에서의 사용을 위해(예컨대 처리된/실행된 샘플 개수의 증가 또는 감소) 용이하게 구성될 수 있다.
- [0014] 일반적으로, 본 발명의 방법 및 키트는 생체 적합한 침강-증강 작용제를 제공하고 혈액 분리 방법 및 시스템의 효율을 크게 증가시켜서, 전체 유핵 세포(TNC)의 회수를 증가시킨다. 특정된 농도 범위에서, 이러한 침강-증강 작용제는 생체 내에서 사용하기에 무독성이고 안전한 것으로 고려된다.
- [0015] 혈구를 포함하는 샘플에서 세포를 침강시키기 위한 방법의 한가지 이상의 예는 응집 작용제와, 약 10 mM 내지 약 100 mM의 최종 농도 범위를 갖는 무독성 증강제(enhancer)를 첨가하는 것을 포함한다.
- [0016] 혈구를 포함하는 샘플에 제공되는 세포를 침강시키는 방법의 예들 중 일부에서, 응집 작용제의 첨가를 포함하고 무독성 증강제는 소듐 시트레이트(sodium citrate) 또는 소듐 석시네이트(sodium succinate) 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0017] 세포를 침강시키기 위한 키트의 몇몇 실시예에서, 키트는 응집 작용제와, 무독성 증강제를 포함하고, 여기에서 무독성 증강제는 소듐 시트레이트 또는 소듐 석시네이트 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0018] 세포를 침강시키기 위한 키트의 몇몇 실시예에서, 키트는 텍스트란, 헤타스타치 또는 젤라틴으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 응집 작용제와, 소듐 시트레이트 또는 소듐 석시네이트 또는 이들의 조합을 포함하는 무독성 증강제를 포함한다.
- [0019] 세포를 침강시키기 위한 방법의 몇몇 실시예는 적혈구를 포함하는 샘플로부터 전체 유핵 세포의 증가된 비율의 최종적인 회수를 향상시키고, 이 방법은 응집 작용제, 무독성 증강제를 첨가하는 단계와, 복수의 RBC를 응집하도록 샘플을 배양하는 단계와, 전체 유핵 세포를 회수하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 본 발명의 여러 가지 특징, 양태 및 장점은, 도면 전체에 걸쳐서 유사한 부호가 유사한 부품을 나타내는 첨부도면을 참고하여 이하의 상세한 설명이 판독될 때 더 잘 이해될 것이다.

도 1은 생체 샘플 및 (증강제를 갖거나 갖지 않는) RBC 응집 작용제가 각각 혼합 용기 및 작용제 리셉터클 내에 있는 것을 도시하는 본 발명의 시스템의 실시예의 개략도이다.

도 2는 (증강제를 갖거나 갖지 않는) 응집 작용제가 추출 장치로 인출되는 것을 도시하는 도 1에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 3은 (증강제를 갖거나 갖지 않는) 응집 작용제가 용기 내의 생체 샘플 내로 혼합되는 것을 도시하는 도 2에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 4는 작용제/샘플 혼합물의 일부가 추출 장치로 인출되는 것을 도시하는 도 3에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 5는 인출된 부분이 용기로 복귀되는 것을 도시하는 도 4에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 6은 침하 상태의 혼합물을 도시하는 도 5에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 7은 추출 장치로 인출되는 침하된 혼합물의 최하부층을 도시하는 도 6에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 8은 추출 장치와 용기 사이에서 폐쇄 위치로 있는 시린지 밸브(syringe valve)를 도시하는 도 7에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 9는 펌프 밸브가 용기와 펌프 사이에서 개방 위치로 있고 혼합물이 용기로부터 도관을 통하여 여과 장치로 시스템을 통하여 유동하는 것을 도시하는 도 8에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 10은 필터 폐기물이 폐기 여과물 리셉터클에 수집되고 샘플이 시스템을 통하여 재순환되는 것을 도시하는 도 9에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 11은 펌프 입구 밸브가 용기에 대해 폐쇄 위치에 있고 폐기 여과물 리셉터클에 대해 개방 위치에 있고 폐기 여과물이 여과 장치 및 도관을 통하여 재순환되는 것을 도시하는 도 10에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 12는 폐기 여과물이 유체 경로에 포집된 타겟 보유물을 대체할 때까지 폐기 여과물이 시스템을 통하여 펌핑되는 것을 도시하는 도 11에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 13은 펌프 입구 밸브가 폐기 여과물 리셉터클에 대해 폐쇄 위치에 있고 용기에 대해 개방 위치에 있고, 펌프 출구 밸브가 펌프와 타겟 보유물 리셉터클 사이에서 개방 위치로 있는 것을 도시하는 도 12에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 14는 타겟 보유물이 타겟 보유물 리셉터클에 수집되는 것을 도시하는 도 13에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 15는 용기의 바닥에 있는 타겟 보유물의 잔류량이 타겟 보유물 리셉터클로 이송되는 것을 도시하는 도 14에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 16은 용기와 타겟 보유물 리셉터클 사이에 있는, 도관 내의 타겟 보유물의 잔류량을 도시하는 도 15에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 17은 폐기 여과물 리셉터클에 대해 개방 위치에 있는 펌프 입구 밸브를 도시하는 도 16에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 18은 폐기 여과물이 도관 내의 잔여 타겟 보유물을 타겟 보유물 리셉터클 내로 가압했을 때까지 폐기 여과물이 도관을 통하여 이송되는 것을 도시하는 도 17에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 19는 펌프 출구 밸브가 타겟 보유물 리셉터클에 대해 폐쇄 위치에 있고 폐기 여과물이 용기로 이송되는 것을 도시하는 도 18에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 20은 시스템 내의 폐기 여과물 및 임의의 잔여 타겟 보유물이 보조 여과물 리셉터클에 수집되는 것을 도시하는 도 19에 도시된 실시예의 개략도이다.

도 21은 텍스트란 단독에 대한, 그리고 소듐 시트레이트와 조합된 텍스트란, 및 소듐 석시네이트와 조합된 텍스트란에 대한 회수된 TNC의 체적의 예를 도시하는 그래프 및 표이다.

도 22는 소듐 시트레이트의 침강 효율의 예를 도시하는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 청구된 발명의 청구요지를 더 분명하고 간결하게 설명하고 지적하기 위해, 이하 설명과 첨부된 특허청구범위에 사용되는 특정 용어에 대해서 이하의 정의가 제공된다. 명세서 전반에 걸쳐, 특정 용어의 예는 비제한적인 예로서 간주되어야 한다.

[0022] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "용기(vessel)"은 적어도 하나의 포트를 갖는 적어도 일시적인 기간 동안에 그 의 한계 내에 액체를 포함할 수 있는 임의의 대상물을 지칭한다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 재료(biological material)"는 2개 이상의 부재료로 응집될 수 있는 생물학적 속성을 갖는 임의의 재료를 지칭한다. 생물학적 재료의 비제한적인 예로는 유핵 세포가 혈장 용액에 남아 있는 동안에 RBC의 응집 및 침강/제거를 통하여 분리될 수 있는 전체 혈액, 제대 혈액 및 골수가 있다.

유헥 세포는 WBC 및 희귀 줄기 세포를 포함한다.

- [0024] 유헥 세포를 처리하기 위한 방법의 일 실시예는 혈액 및 골수를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 세포 샘플로부터, 희귀 줄기 세포지만 이에 제한되지는 않는 유헥 세포의 분리 및 농축을 일반적으로 포함한다. 여과 기반 실시예는 일반적인 2개 단계를 포함한다. 제1 단계는 증강 작용제(예컨대 소듐 시트레이트, 소듐 석시네이트)가 첨가되거나 첨가되지 않으면서, 적혈구 응집 작용제(예컨대 텍스트란)와 같은 침하 용액과 세포 샘플을 접촉시키는 것을 포함한다. 이 예시적인 실시예에서의 증강 작용제는 RBC 침강 속도를 향상시키고 그리고/또는 침강에 이은 최종 RBC 패킹된 체적을 감소시키도록 첨가된다. 그 후, 응집된 RBC는 배액(drainage), 인출 또는 이송의 임의의 다른 수단에 의해 유헥 세포 및 혈장을 포함하는 상부 분획물로부터 제거된다. 제2 단계는 RBC-제거된 샘플을 여과함으로써 체적 감소 및 유헥 세포 농축을 포함한다. 여과의 한가지 예에서는 중공-섬유 여과 카트리지가 뉴저지주 피스카타웨이에 소재한 제너럴 일렉트릭 헬스케어(General Electric Healthcare)를 이용한다. 이 실시예에서는 높은 세포 회수[예컨대 최소 세포 포집(trapping)], 최소 세포 손상 및 신속한 처리 시간을 제공한다. 본 방법의 이러한 예에서는 자동화된 폐쇄-시스템에 사용되도록 구성될 수 있다. 방법 및 시스템은, 제대 혈액 및 다른 세포 샘플 재료를 포함하지만 이에 제한되지 않는 복합 생물학적 재료를 무균 처리하도록 구성될 수 있다.
- [0025] 예
- [0026] 단순한 여과, 원심 분리 또는 자기 분리 단독이 아니라, 여과 이후에 분리를 결합시킨 2단계의 자동화된 예시적 방법은, (1) 전체 유헥 세포(TNC) 회수를 증가시키고, (2) RBC 제거를 증가시키고, (3) 원심 분리기의 샘플 홀더의 고정된 물리적 치수로 인해 원심 분리보다 샘플 체적의 범위(예컨대 50 내지 300mL)를 취급함에 있어서 더 큰 유연성을 제공한다. 고정된 사이스를 갖는 원심 분리기와는 달리, 시스템 및 방법에 사용되는 필터는 샘플 체적에 따라 크기 조절될 수 있다.
- [0027] 개시 재료의 체적은 (예컨대 중량, 육안 검사에 의해) 결정된다. RBC 응집 작용제의 요구량은 바람직한 화학량론 비(혈액 대 텍스트란, 일반적으로 1:1 또는 1:2)에 기초하여 계산된다.
- [0028] 세포 샘플 개시 재료는 처리 용기로 이송된다. RBC 응집 작용제(들)은 또한 처리 용기로 이송된다. 이후, 샘플 및 작용제는 혼합되고, RBC 응집 및 중력 침강을 위해 ~20분을 배양하도록 허용된다.
- [0029] 이후 응집 RBC 분획물은 [예컨대 펌핑, 팻팅(pipetting) 또는 배액에 의해] 상부 백혈구 세포(WBC)/혈장 분획물로부터 용기로부터 추출된다. 이후, 잔여 WBC/혈장 분획물은 적절한 구멍 크기(예컨대 대략 0.65 μm 구멍)를 갖는 여과 장치(예컨대 중공 섬유 카트리지)로 (예컨대 펌핑, 정압 또는 부압에 의해) 이송된다. 잉여 혈장은 여과 장치를 통과하고, 폐기 여과물 리셉터클에 수집되는 반면, WBC는 유지된다.
- [0030] 분획물 샘플은 샘플 체적이 바람직한 최종 체적(예컨대 5 내지 20 mL)으로 집중될 때까지 여과 장치를 통하여 재순환된다. 샘플은 일반적으로 장기간 저온 저장을 위해 타겟 보유물 리셉터클로 이송된다. 필터 및 튜빙은 일반적으로 혈장 및/또는 공기를 사용하여 이러한 "불용 체적(dead volume)"에서 존재하는 세포를 회수하기 위해 정화된다. 이후, 이 재료는 농축된 샘플에 첨가된다. 높은 전체 유헥 세포 회수(>85%) 및 생존율(>95%)이 달성된다.
- [0031] 도 1은 생체 샘플 및 증강 작용제가 각각 혼합 용기 및 작용제 리셉터클 내에 있는 것을 도시하는 시스템의 실시예의 개략도이다. 도 1에서 시스템(10)으로서 일반적으로 칭해지고 도시된 시스템의 실시예는, 생물학적 재료를 내장하고 생물학적 재료가 2개 이상의 특정 부재료로 분리되게 하기 위한 용기(12)와; 부재료들 중 적어도 하나를 용기로부터 제거하기 위한 추출 장치(16)와; 여과 장치(20)와; 용기와 여과 장치 사이에서 하나 이상의 부재료를 이송하는 도관(18)과; 부재료들 중 하나 이상이 용기와 여과 장치 사이에서 도관을 통해 이송되는 것을 적어도 제어하기 위한 제어 장치(30)를 포함한다. 이 실시예는 단지 시스템의 예시 구성이다. 구성요소의 개수 및 유형은 주어진 셋업(set up) 및 순서를 위해 필요에 따라 변경될 수 있고 시스템을 통과하는 재료의 유동은 필요한 만큼 변경될 수 있다. 예컨대, 재료는 다양한 구성 및 구성요소를 사용하여 추출되고 저장되고 배출되고 혼합될 수 있다.
- [0032] 도 1에 도시된 실시예에서, 용기(12)는 상부에 개구를 갖고, 개구를 통하여, 이 예에서 밸브(34)와 유체 연통하고 있는 시린지인 추출 장치는 공정 동안에 다양한 시점에 작용제를 도입하고 용기(12)로부터 재료 및 부재료를 인출한다.
- [0033] 시스템(10)은 하나 이상의 여과물을 적어도 일시적으로 저장하기 위한 리셉터클을 또한 포함한다. 이 실시예에서 리셉터클 중 하나는 폐기 여과물 리셉터클(22) 및 타겟 보유물 리셉터클(24)이다. 시스템(10)은 타겟 보유

물을 타겟 보유물 리셉터클 내로 선택적으로 유도하기 위한, 도관을 따른 밸브(30)와; 도관을 통하여 적어도 부분적으로 폐기 여과물을 선택적으로 재순환시키기 위한, 도관을 따른 밸브(28)와; 하나 이상의 작용제를 용기(12) 내로 선택적으로 도입하고 작용제를 샘플과 혼합하도록 용기(12)로부터 재료를 추출하고 부재료의 응집 이후에 부재료 중 하나 이상을 용기(12)로부터 추출하기 위한 밸브(34)를 더 포함한다.

[0034] 시스템(10)은 센서(32)와 같은 하나 이상의 센서를 또한 포함할 수 있다. 센서(32)는, 용기 내의 주어진 위치에서의 부재료의 존재와, 온도, pH, 습도 및 압력이지만 이제 제한되지 않는 용기 내의 환경적인 조건과, 생물학적 재료 또는 부재료의 품질 또는 특성을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 용기(12) 내의 재료의 하나 이상의 파라미터를 감지하는데 사용될 수 있다. 센서는 광학 센서, 초음파 센서, 압전 센서, 모션 센서, RFID 센서, 전자기 센서 및 부하 센서일 수 있다.

[0035] 시스템(10)은 펌프(26), 추출 장치(16) 및 밸브(28, 34 및 30)를 자동화하고 조정하기 위한 제어 서브시스템(30)(또한 본원에서 제어기로 지칭됨)을 포함한다. 제어 서브시스템(30)은, 시스템의 사용자로부터 입력을 수신하고 시스템을 사용하여 처리될 용기(12) 내로 도입된 재료의 양 및 유형에 기초로 하여 용기(12)에 첨가될 작용제의 양 및/또는 유형을 자동적으로 결정하도록 구성될 수 있다. 시스템은 주어진 시스템의 구성에 따라서 제어 서브시스템에 의해 완전히 또는 부분적으로 자동화될 수 있다. 작용제는 처리될 재료 및 부재료의 양 또는 유형에 따라서 필요에 따라 시스템에서 포트 내에 삽입되는 제거 가능한 카세트 내에 포함될 수 있다.

[0036] 시스템(10)은 시스템의 다양한 구성요소들 사이에서 하나 이상의 부재료가 이송되는 것을 용이하게 하기 위해, 도관과 유체 연통하는 펌프(26)를 더 포함한다. 이 실시예의 펌프(26)는 연동 펌프이지만, 시스템의 구성에 적합한 임의의 펌프를 포함할 수 있다.

[0037] 시스템의 용기(12)는 2개 이상의 부재료의 상대적인 중량에 기초하여 적어도 부분적으로 재료를 응집된 부재료로 분리시키도록 구성될 수 있다. 부재료는 침강 층들로 분리되고, 이 실시예의 추출 장치는 침강 층들 중 하나 이상을 인출하거나 달리 추출하도록 구성된다. 도 1에 도시된 실시예에서, 추출 장치(16)는 일단 부재료가 그들의 각각의 침강 층으로 분리되었다면 용기 내의 최하부층을 인출하기 위해 용기(12)의 바닥을 향해 위치되는 말단부를 갖는 픽업 라인(pick up line)을 포함한다. 추출 장치는 용기에 대한 추출 장치의 구성에 따라서 최하부와 최상부 사이에 있는 하나 이상의 층들 또는 용기 내의 최상부층을 대안적으로 또는 부가적으로 인출할 수 있다.

[0038] 작용제 리셉터클(14)과 유체 연통하는 시린지(16)는 밸브(34)와 함께, 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이 결정된 양의 작용제를 작용제 리셉터클로부터 선택적으로 제거하고 결정된 양의 작용제를 용기(12) 내로 도입한다. 이 예의 추출 장치는, 도 4 및 도 5에 도시된 바와 같이 재료가 작용제와 혼합되는 것을 용이하게 하기 위해, 작용제가 이전에 도입되었던 용기로부터 추출 장치 내로 결정된 양의 재료를 인출하고 이후 인출된 재료를 용기 내로 다시 복귀시키도록 추가로 구성될 수 있다. 혼합 단계를 수행하기 위해, 밸브(34)는 리셉터클(14)에 대해 폐쇄되고 용기(12)에 대해 개방되어 시린지(16)와 용기(12) 사이의 유체 연통을 개방한다. 일단 응집 작용제가 용기(12)에서 재료(예컨대 전체 혈액)와 혼합된다면, 혼합물은 다양한 침강 층 내로 침하할 시간을 통상적으로 필요로 한다. 예컨대 텍스트란 및 소듐 시트레이트와 혼합되는 전체 혈액 또는 체대 혈액에 있어서, 도 6에 도시된 바와 같이 20분 이내에 침하가 발생되어야 한다.

[0039] 센서(32)와 같은 감지 장치는 부재료가 응집되었고 용기 내에서 부재료의 들 중 적어도 하나의 위치 또는 레벨을 결정함으로써 그들의 각각의 층으로 분리되었을 때를 결정한다.

[0040] 가능한 작용제의 비제한적인 예는, 전체 혈액이 처리되고 있는 이 예에 사용되기 위해, 텍스트란[응집제(aggregant)], 소듐 시트레이트 및 소듐 석시네이트이고, 소듐 시트레이트 및 소듐 석시네이트 양자 모두는 응집을 향상시킨다. 작용제의 이러한 3가지 예는, 생체 샘플에서, WBC 및 RBC와 같은 다양한 유형의 부재료의 응집 및 침강을 개시하고 가속시키기 위해 응집 작용제 및/또는 응집 증강 작용제로서 작용함으로써 방법 및 시스템을 개선했다.

[0041] 도 7은 시린지(16) 내로 인출되는 침하된 혼합물의 최하부층을 도시하는 도 6에 도시된 실시예의 도면이다. 시스템은 층들 중 하나 이상이 미리 결정된 세트 포인트에 도달될 때까지, 도 7에 도시된 RBC와 같은, 층들 중 하나 이상을 추출하도록 구성될 수 있다. 센서(32)는 세트 포인트가 도달될 때를 결정하는데 사용될 수 있다. 일단 RBC가 시린지(16) 내로 인출된다면, 밸브(34)는 RBC가 용기 내로 누출되는 것을 방지하기 위해 시린지(16)와 용기(12) 사이에서 폐쇄된다. 도 8은 폐쇄 위치에서 추출 장치와 용기 사이에 밸브(34)를 보여주는 도 7에 도시된 실시예의 도면이다.

- [0042] 도 9는 펌프 밸브(28)가 용기와 펌프(26) 사이에서 개방 위치로 있고 혼합물이 용기(12)로부터 도관(18)을 통하여 여과 장치(20)로 시스템을 통하여 이동하는 것을 도시하는 도 8에 도시된 실시예의 개략도이다. 혼합물이 여과 장치(20)를 통해 여과될 때, 이 예에서 혈장인 필터 폐기물은 도 10에 도시된 바와 같이 폐기 여과물 리셉터클(22)에 수집된다. 시스템은 용기(12)를 통하여 재순환하는 샘플의 체적이 소정 레벨에 도달될 때까지, 여과 장치(20)를 통과하는 샘플을 계속하여 재순환시키도록 구성될 수 있다. 예컨대, 센서는 용기(12) 내의 전체 유핵 세포(TNC)의 농도 레벨을 광학적으로 모니터링하는데 사용될 수 있다.
- [0043] 여과 장치(16)를 깨끗이 하기 위해, 펌프 입구 밸브(28)는 용기에 대해 폐쇄되고 폐기 여과물 리셉터클(22)에 대해 개방되어서, 폐기 여과물이 도관(18)과 여과 장치(20)(도 11)를 통하여 재순환되는 것을 허용한다. 도 12는 폐기 여과물이 유체 경로에 포집된 타겟 보유물(예컨대 TNC)을 대체할 때까지 폐기 여과물이 시스템을 통하여 펌핑되는 것을 도시하는 도 11에 도시된 시스템(10)의 개략도이다.
- [0044] 타겟 보유물은 생물학적 재료로부터 분리되고 타겟 보유물 리셉터클(24) 내에 수집되도록 의도되는 부재료들 중 하나 이상을 포함한다. 이 예에서, 타겟 보유물은 TNC를 포함한다. 타겟 보유물 리셉터클은 다양한 혈액 성분을 위한 수집 백과 같은 주어진 목적에 적합한 임의의 리셉터클일 수 있다. 처리되는 재료에 따라 좌우되는 복수의 폐기물 및 타겟 보유물 리셉터클이 있을 수 있다. 복수의 리셉터클에 부가적으로 또는 대안으로, 폐기물 및 타겟 보유물 리셉터클은, 수집되는 것이 바람직한 하나보다 많은 부재료가 있을 때 일 공정으로부터 타 공정으로 그리고 단일 공정 세션 동안에 교체될 수 있다. 시스템은 주어진 개시 재료 내의 부재료의 가변 유형을 포획하고 분류하기 위해, 일련의 여과 장치와 폐기물 및 타겟 보유물 리셉터클을 또한 포함할 수 있다.
- [0045] 도 13은 펌프 입구 밸브(28)가 폐기 여과물 리셉터클에 대해 폐쇄 위치에 있고 용기에 대해 개방 위치에 있고, 도 14에 도시된 바와 같이 타겟 보유물이 타겟 보유물 리셉터클 내에 수집되도록 펌프 출구 밸브(30)가 펌프와 타겟 보유물 리셉터클 사이에서 개방 위치로 있는 것을 도시하는 도 12에 도시된 단계에 후속되는 시스템(10)을 도시한다.
- [0046] 도 15에 도시된 바와 같이, 심지어 용기의 바닥에 있는 적은 잔류량의 타겟 보유물조차도 타겟 보유물 리셉터클로 이송될 수 있다. 그러나, 잔여량의 타겟 보유물은 도 16에 도시된 바와 같이 용기와 타겟 보유물 리셉터클 사이에서 도관 내에 남아있을 수 있다. 도관 내의 이 잔여 타겟 보유물을 배출시키고 수집하기 위해, 펌프 입구 밸브(28)는 폐기 여과물이 폐기 여과물이 도관 내의 잔여 타겟 보유물을 타겟 보유물 리셉터클 내로 가압했을 때까지(도 18) 폐기 여과물이 도관(18)을 통하여 펌핑되는 것을 허용하도록 폐기 여과물 리셉터클에 대해 개방된다(도 17).
- [0047] 시스템의 최종 배출로서, 폐기 여과물(예컨대 혈장)은 시스템을 통하여 배출될 수 있다. 도 19에 도시된 바와 같이, 펌프 출구 밸브는 타겟 보유물 리셉터클에 대해 폐쇄되고, 폐기 여과물은 전체 시스템으로부터 배출하고 용기 내의 임의의 잔여 부재료를 수집하도록 시스템을 통하여 펌핑된다. 이후, 용기 내의 부재료의 이러한 수집은 교체 가능한 보조 여과물 리셉터클에, 또는 이외에 타겟 보유물 리셉터클(24)에 수집될 수 있다(도 20).
- [0048] 도 1에 도시된 시스템의 여과 장치는 말초 혈액, 제대 혈액 및/또는 골수와 같은 복합 체액으로부터 세포 분획물을 분리할 수 있다. 시스템(10)의 여과 장치를 제조하기 위한 방법의 예가 아래에 제공된다.
- [0049] 시스템(10)은 시스템을 통하여 처리될 수 있는 다양한 재료, 부재료 및 작용제에 대한 정보 및 데이터와, 시스템이 적응될 수 있는 기계적이고 환경적인 변수에 대한 정보를 저장하기 위한 메모리 저장 장치와 같은 다른 부속 부품을 포함할 수 있다. 시스템은 시스템의 센서에 의해 수집되는 정보 및 데이터에 응답하여 주어진 공정의 상태 및 역학을 직관적으로 조절하도록 프로그래밍될 수 있다. 메모리 저장 장치는 CPU(중앙 처리 유닛)의 ROM(판독 전용 메모리), RAM(랜덤 액세스 메모리) 또는 DRAM(다이나믹 랜덤 액세스 메모리)과 같은 프로세서와 관련된 임의의 적절한 하드 드라이브 메모리, 또는 DVD 또는 CD, 또는 zip 드라이브(zip drive) 또는 메모리 카드 또는 스틱과 같은 임의의 적절한 디스크 드라이브 메모리를 포함할 수 있다. 메모리 저장 장치는 시스템으로부터 원격으로 위치될 수 있고, 하드에 내장되거나 무선인 것에 상관없이, 근거리 네트워크, 케이블 네트워크, 위성 네트워크 및 인터넷을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 임의의 적절한 연결 장치 또는 통신 네트워크를 통하여 접근될 수 있다. 프로세서 또는 CPU는 마이크로프로세서, 마이크로컨트롤러, 및 디지털 신호 프로세서(DSP)를 포함할 수 있다.
- [0050] 시스템은 정보 및 데이터를 컴파일링하고 그리고/또는 레포트를 생성하기 위해, 사용자가 정보를 시스템 내로 입력하게 하고 복수의 실행 또는 주어진 프로세스 실행에 대한 정보 및 데이터를 액세스하고 디스플레이하게 하도록 디스플레이 장치 및 엔트리 장치(entry device)를 더 포함할 수 있다. 디스플레이 장치는 LCD 또는 CRT를

합체시킨 장치이지만 이에 제한되지는 않는 디지털 이미지를 디스플레이할 수 있는 임의의 적절한 장치를 포함할 수 있다.

- [0051] 달리 지시되지 않는다면, 부정관사 "일"는 부정관사 "일"에 의해 수식된 단어의 하나 또는 하나보다 많은 것을 지칭한다. 달리 지시되지 않는다면, 명세서 및 특허청구범위에 기재된 성분량, 분자량과 같은 속성, 반응 상태를 나타내는 모든 숫자는 용어 "약"에 의해 모든 경우에서 수식되는 것으로 이해되는 것이다. 따라서, 반대로 지시되지 않는다면, 이하의 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 기재된 수치 매개변수는 본 발명에 의해 얻어지도록 요구되는 바람직한 속성에 따라서 변할 수 있는 근사값이다. 적어도 그리고 특허청구범위의 범위에 대한 균등론의 적용을 제한하려는 의미는 아니지만, 각각의 수치 매개변수는 보편적인 반응법 기술을 적용함으로써 그리고 보고된 유효 숫자의 개수의 관점에서 적어도 해석되어야 한다.
- [0052] "응집 작용제(agggregating agent)"는 혈구의 응집을 용이하게 하는 것을 돕는 분자로서 본원에서 지칭된다. 응집 작용제의 예로는 피브리노겐(fibrinogen) 또는 감마 글로불린(gamma globulin)과 같은 일정한 단백질과 같은 높은 분자량 중합 분자; 젤라틴 및 텍스트란, 헤타스타치, 펜타스타치(pentastarch) 및 폴리 에틸렌 그리콜(poly ethylene glycol; PEG)과 같은 일정한 폴리사카라이드(polysaccharides)가 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0053] "키트(kit)"는 스핀 컬럼(spin column) 또는 에펜도프(eppendorf) 튜브와 같은 다른 선택 재료, 반응 상태를 유지하는데 필요한 임의의 버퍼(buffer), 키트에 존재하는 반응물을 이용하기 위한 지시의 세트, 및 주어진 분석 또는 테스트를 위해 필요한 하나 이상의 반응물로서 칭해진다.
- [0054] 혈구를 침강시키기 위한 본 발명의 방법 및 키트는 RBC 침강을 가속하기 위해, 소듐 시트레이트 또는 소듐 석시네이트와 같은 하나 이상의 무독성 증강제를 첨가하는 것을 일반적으로 포함한다. 소듐 시트레이트 및 소듐 석시네이트가 의료 행위에 비경구로 이미 사용되었기 때문에, 이러한 방법 및 키트의 무독성 증강제는 인간에 있어서 생체 내 적용하는데 안전하고 RBC를 침강시킨 후에 회수된 세포는 치료 목적으로 사용될 수 있다.
- [0055] 적혈구의 침강을 개선하기 위한 방법의 하나 이상의 예는 다양한 치료 적용에 바람직한 높은 세포 생존율을 갖는 TNC와 같은 고순도의 세포의 회수를 증가시킨다.
- [0056] 방법들 중 하나 이상에 사용된 무독성 증강제는 침강 속도를 증가시킨다. 방법들 중 하나 이상에 사용된 무독성 증강제의 비제한적인 예는 소듐 시트레이트, 소듐 석시네이트 및 이들의 조합이다.
- [0057] 몇몇 예에서, 세포를 침강시키기 위한 방법은 응집 작용제 및 무독성 증강제를 다양한 농도 범위로 첨가함으로써 처리되는 혈구를 포함하는 샘플을 제공하는 것을 포함한다. 적절한 농도 범위의 예로는 10 mM 내지 100 mM, 12.5 mM 내지 75 mM, 25 mM 내지 75 mM, 및 50 mM 내지 75 mM이 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 몇몇 예에서, 샘플에서 세포를 침강시키기 위한 방법은 약 12.5 mM 내지 약 100 mM으로부터의 최종 농도 범위를 갖는 응집 작용제 및 무독성 증강제의 첨가에 의해 처리되는 혈구를 제공하는 것을 포함하고, 여기에서 무독성 증강제는 소듐 시트레이트, 소듐 석시네이트 또는 이들의 조합이다. 몇몇 실시예에서, 응집 작용제는 텍스트란을 포함하고, 무독성 증강제는 소듐 시트레이트, 소듐 석시네이트 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0059] 세포를 침강시키기 위한 키트의 실시예들 중 하나 이상은 응집 작용제 및 무독성 증강제를 포함한다. 세포를 응집시키기 위한 키트의 실시예들 중 하나 이상은 응집 작용제 및 무독성 증강제를 포함하고, 무독성 증강제는 소듐 시트레이트 또는 소듐 석시네이트 또는 이들의 조합을 포함한다. 세포를 응집시키기 위한 키트의 실시예들 중 하나 이상은 텍스트란인 응집 작용제 및 무독성 증강제를 포함한다.
- [0060] 고순도 및 높은 생존율을 갖는 세포를 회수하는 방법은 일반적으로, 침강을 위해 무독성 증강제와 조합하여 응집 작용제를 사용한다. 예컨대, 예들 중 하나에서, 적혈구를 포함하는 샘플은 응집 작용제 및 무독성 증강제를 첨가함으로써 처리되고, 이후에 샘플의 배양 및 TNC의 최후 회수가 후속된다.
- [0061] 적혈구를 포함하는 샘플로부터 일정 비율의 TNC를 회수하는 방법들 중 하나 이상은 미리 정해진 농도로 응집 작용제 및 무독성 증강제를 첨가한 후 샘플의 배양 및 전체 유효 세포의 최후 회수가 이어지는 것을 포함한다. 특정 실시예에서, 증강제는 소듐 시트레이트 또는 소듐 석시네이트 또는 이들의 조합이다.
- [0062] 예
- [0063] 본 발명의 실시는 이하의 예들로부터 보다 완전히 이해될 것이고, 이하의 예들은 단지 예시로서 나타내어지고,

어쨌든 발명을 제한하는 것으로 구성되어서는 안된다.

[0064]

예 1

[0065]

재료: 인간 말초 혈액은 실험에 사용되었다. 이 예에서 사용된 텍스트란 T500은 덴마크에 소재하는 파마코스모스 에이/에스(Pharmacosmos A/s)로부터 획득되었고, 소듐 시트레이트 디하이드레이트(sodium citrate dihydrate)는 제이 티 베이커(J T Baker)로부터 획득되었고, 소듐 석시네이트는 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마(Sigma)로부터 획득되었다.

[0066]

적혈구 응집 정도는 다양한 생체 적합 증강제의 존재 시에 생체 내에서 측정되었다. 응집 증강제가 없는 제어 샘플은 3% 텍스트란 T500을 함유하는 포스페이트 완충 식염수(phosphate buffered saline)(PBS)의 2.4 ml와, 혈액 샘플의 2.4 ml를 혼합함으로써 준비되었고 이후 배양되었다(텍스트란의 최종 농도는 1.5%였다). 2개의 테스트 샘플이 또한 준비되었다. 제1 테스트 샘플은 3% 텍스트란 T500 및 100 mM 소듐 시트레이트를 함유하는 PBS의 2.4 ml와, 혈액 샘플의 2.4 ml를 혼합함으로써 준비되었고 이후 배양되었다(텍스트란의 최종 농도는 1.5%였고 소듐 시트레이트의 최종 농도는 50 mM였다). 제2 테스트 샘플은 3% 텍스트란 T500 및 100 mM 소듐 석시네이트를 함유하는 PBS의 2.4 ml와, 혈액 샘플의 2.4 ml를 혼합함으로써 준비되었고 이후 배양되었다(텍스트란의 최종 농도는 1.5%였고 소듐 석시네이트의 최종 농도는 50 mM였다). 테스트 샘플과 제어를 위한 배양 시간은 실온에서 약 20분이었다.

[0067]

적혈구의 침강 후에, 상청액(supernatant)이 회수되었다. 이후, 회수된 상청액의 체적이 측정되었다. 각 실험은 3번(n=3) 반복되었고, 각 세트에 대한 표준 편차가 계산되었다. 최종 데이터는 도 21에서 막대 그래프로 나타내어진다. 제어(텍스트란 단독)에 대한 표준 편차의 수치가 높을수록, 상청액의 회수가 감소되고 덜 밀집되기(compaction) 쉽다.

[0068]

도 21은 적혈구 응집에 대한 소듐 시트레이트 및 소듐 석시네이트의 영향의 예를 도시한다. 텍스트란의 존재 시 회수되는 상청액의 체적은 제어부로서 기능을 하고, 그에 대해 소듐 시트레이트 및 텍스트란의 존재 시 또는 소듐 석시네이트 및 텍스트란의 존재 시 회수되는 상청액의 체적이 비교된다. 응집 정도는 회수된 상청액 체적을 반영한다. 증가된 밀집으로 인해 더 나은 응집을 발생시켜서 더 나은 상청액 회수를 발생시킨다. 이 실험은 실온에서 수행되었고, 이 예에서 응집을 위한 배양 시간은 약 20분이었다.

[0069]

예 2

[0070]

적혈구 응집의 효율은 무독성 증강제의 가변 농도의 존재 시 생체 내에서 측정되었다. 증강제를 갖지 않고 1.5% 텍스트란 T500으로 배양되는 혈액 샘플은 제어부로서 기능을 한다. 제어 샘플은 3% 텍스트란 T500을 함유하는 PBS의 2.0 ml와, 혈액 샘플의 2.0 ml를 혼합함으로써 준비되었다. 증강제로서의 소듐 시트레이트의 12.5 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM 및 100 mM 및 1.5% 텍스트란 T500을 함유하는 혈액 샘플은 테스트 샘플로서 기능을 했다. 테스트 샘플은 각각 소듐 시트레이트의 25 mM, 50 mM, 100 mM 및 150 mM 및 3.0% 텍스트란 T500을 함유하는 PBS의 2.0 ml와, 혈액 샘플의 2.0 ml를 혼합함으로써 준비되어서, 각 테스트 샘플에 있어서 12.5 mM, 25 mM, 50 mM 및 75 mM와 각 테스트 샘플에서 텍스트란에 대한 1.5%의 최종 농도에 도달한다. 테스트 세트 및 제어를 위한 샘플은 실온에서 20분 동안 배양되었다.

[0071]

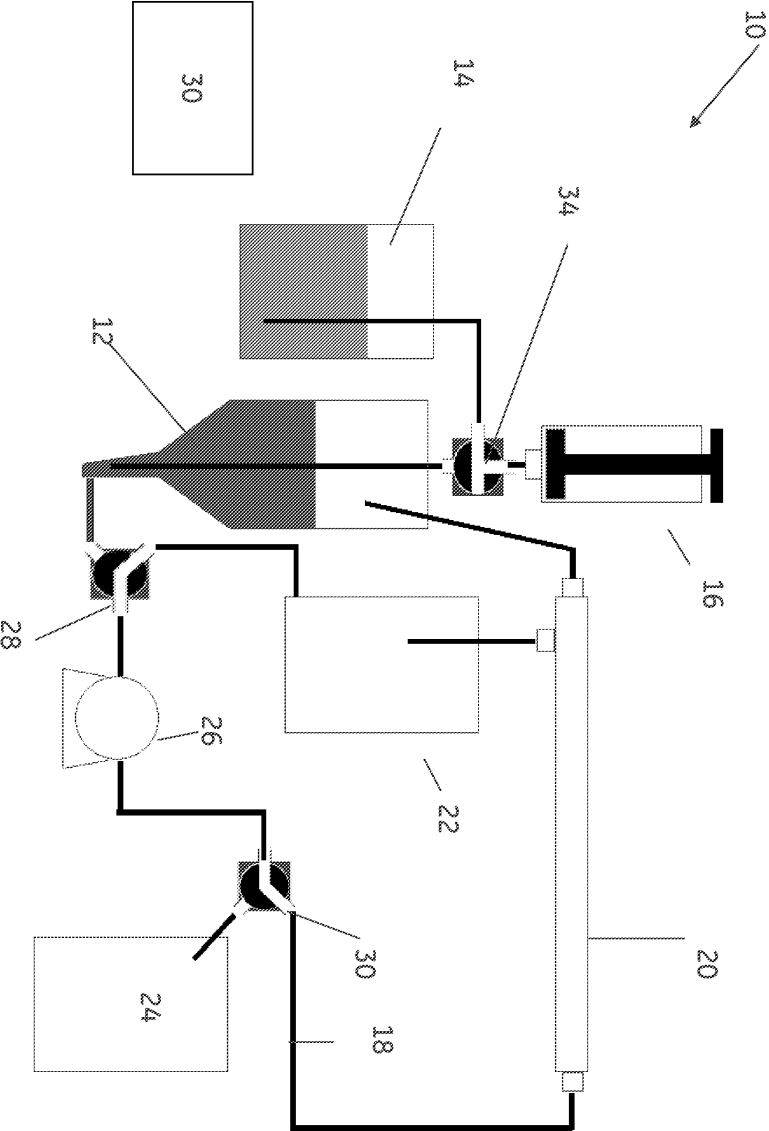
적혈구의 침강 후에, 유체가 회수되었다. 이후 회수된 상청액의 체적이 측정되었다. 각 실험은 3번(n=3) 반복되었고, 각 세트에 대한 표준 편차가 계산되었다. 최종 데이터는 도 22에서 막대 그래프로 나타내어진다.

[0072]

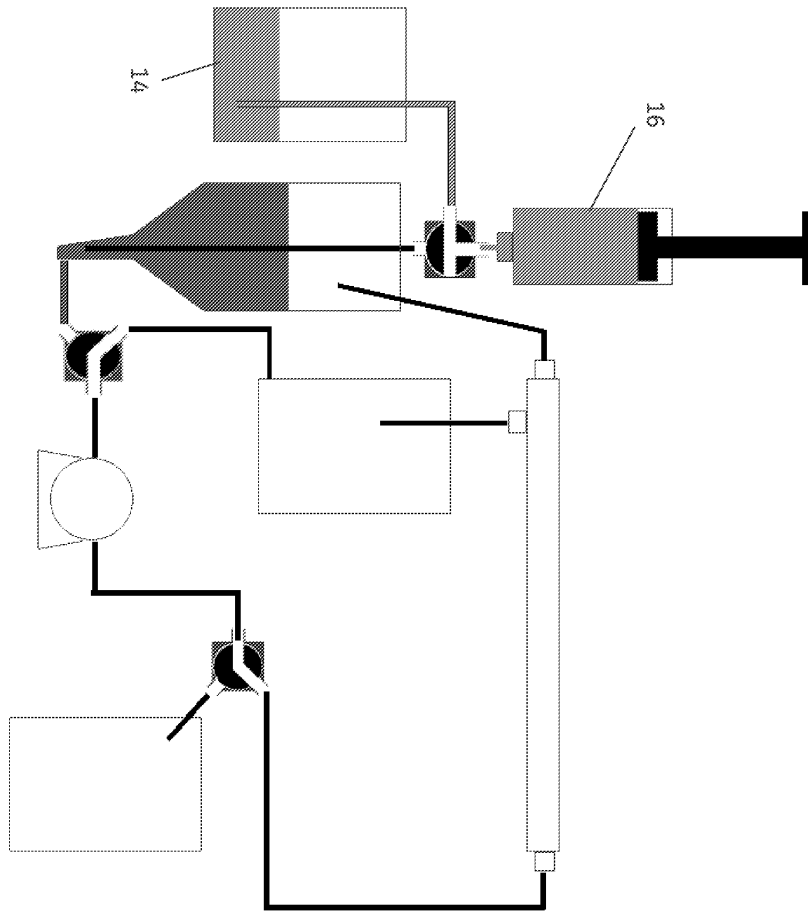
본 발명의 일정한 특징들만이 여기에서 도시되고 설명되었지만, 당해 분야의 숙련자에 의해 많은 변형 및 변경이 이루어질 것이다. 따라서, 첨부된 특허청구범위는 본 발명의 진정한 기술사상 내에 있는 이러한 변형 및 변경 모두를 포함하도록 의도된다고 이해되어야 한다.

도면

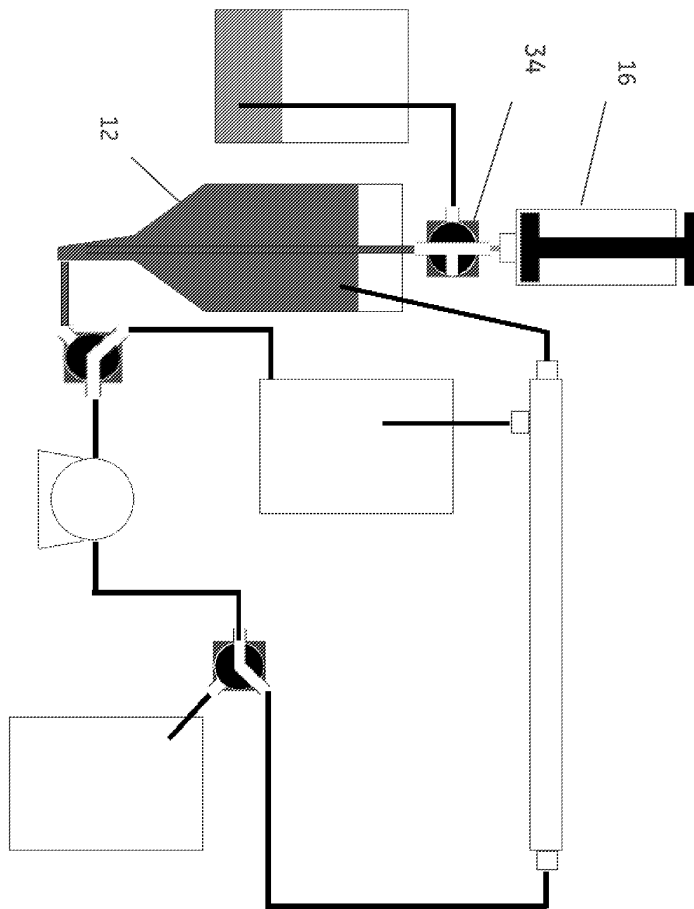
도면1



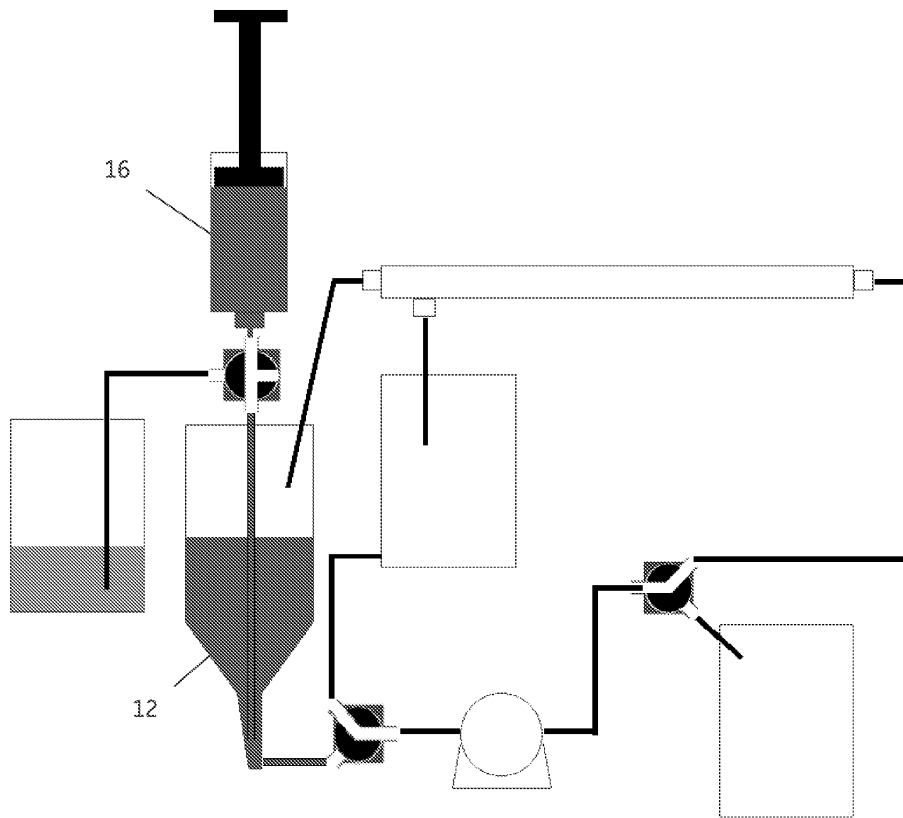
도면2



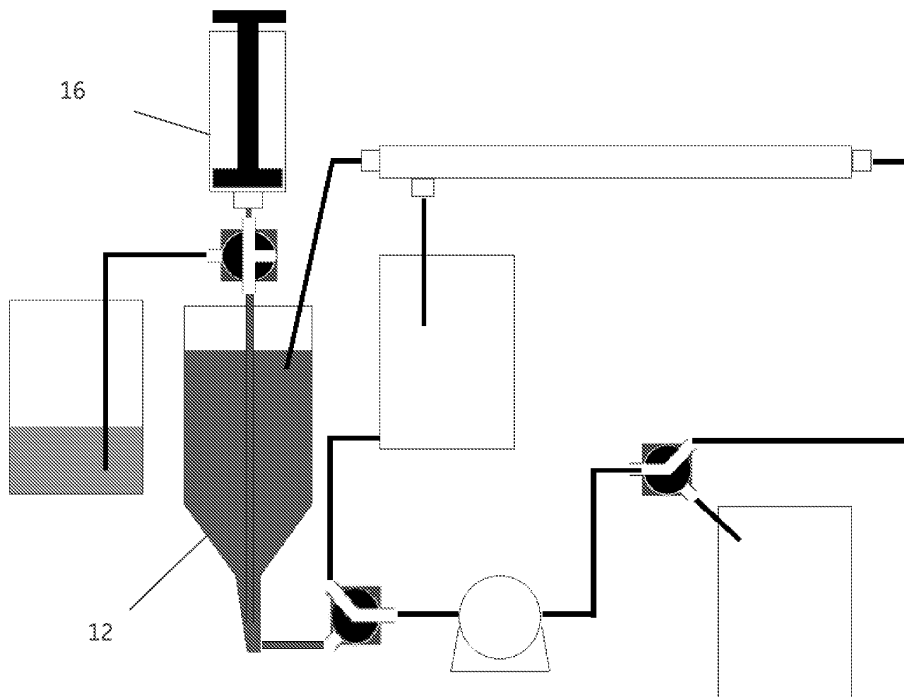
도면3



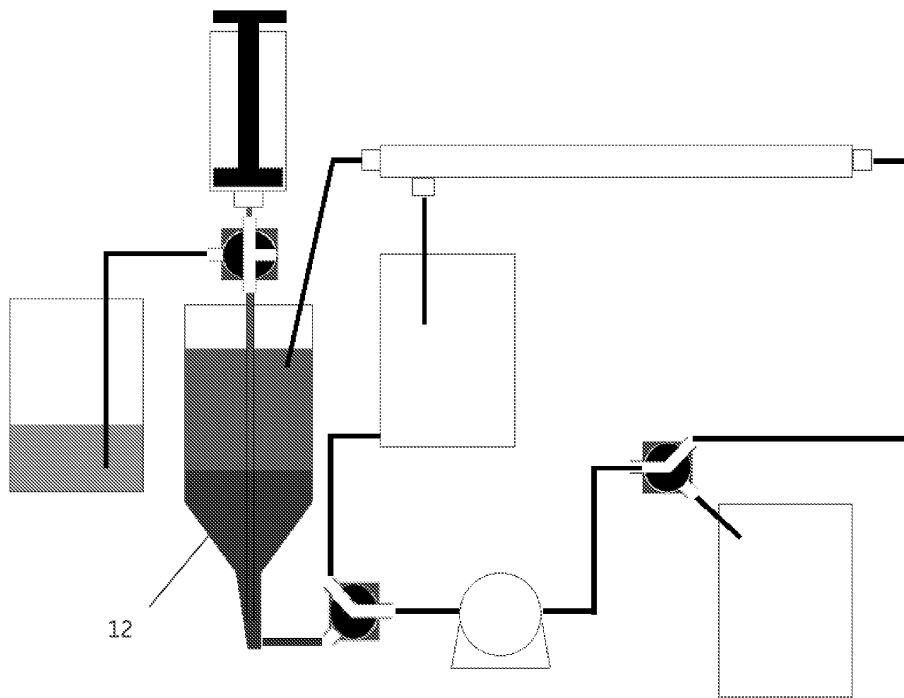
도면4



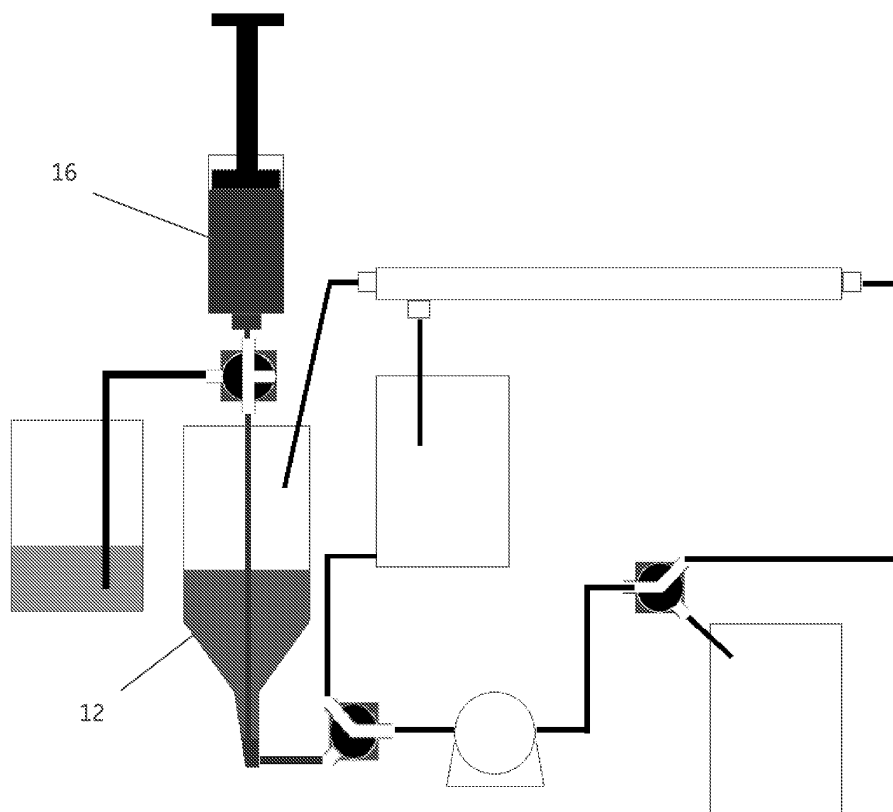
도면5



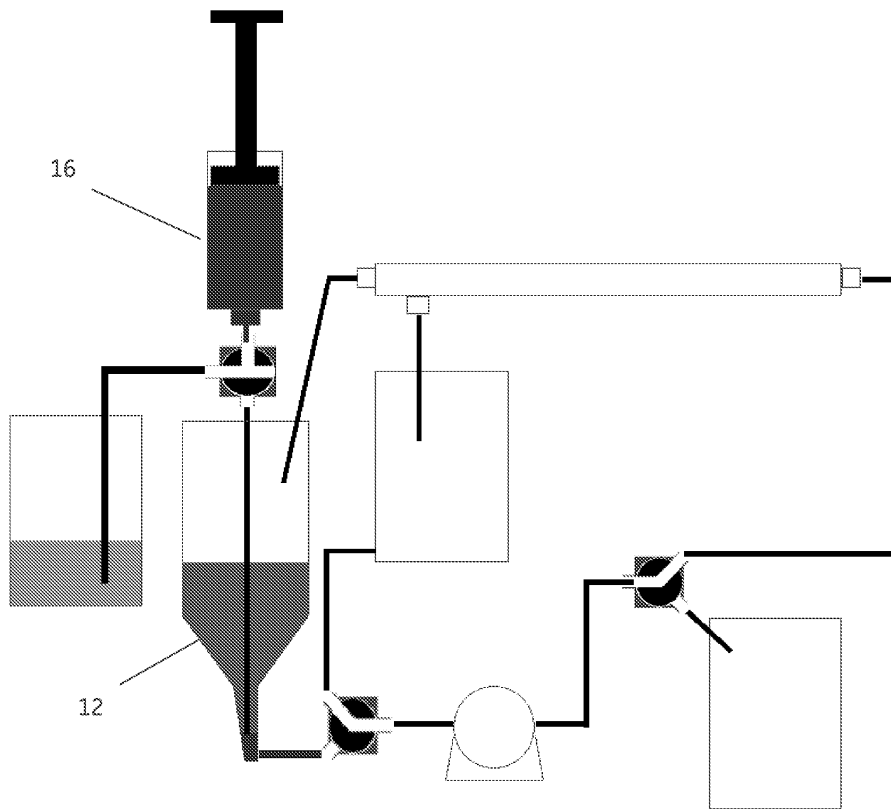
도면6



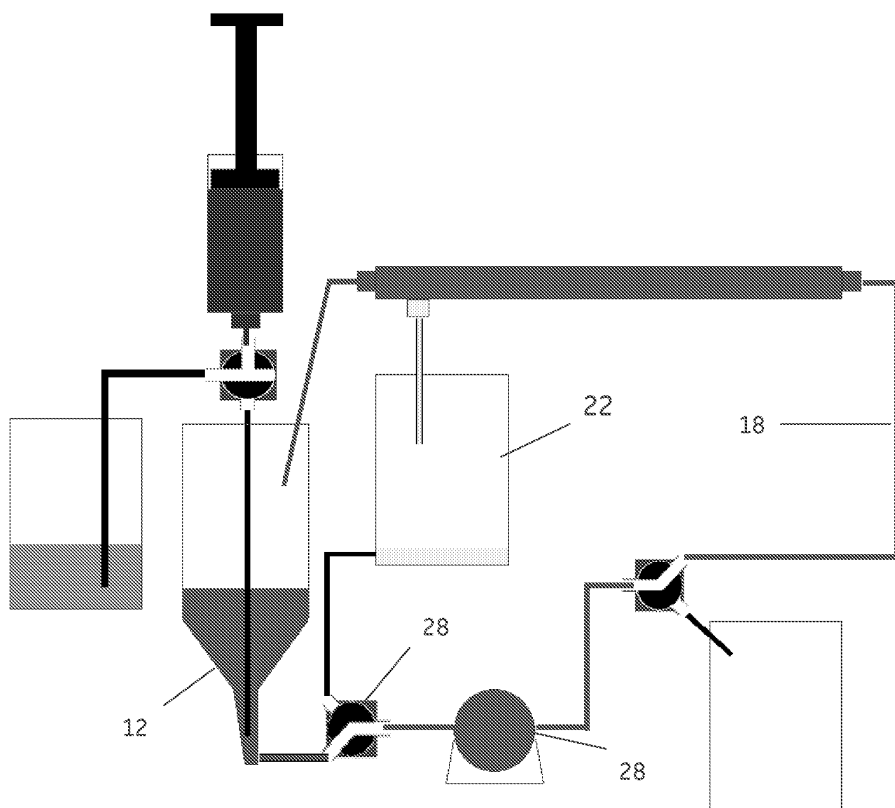
도면7



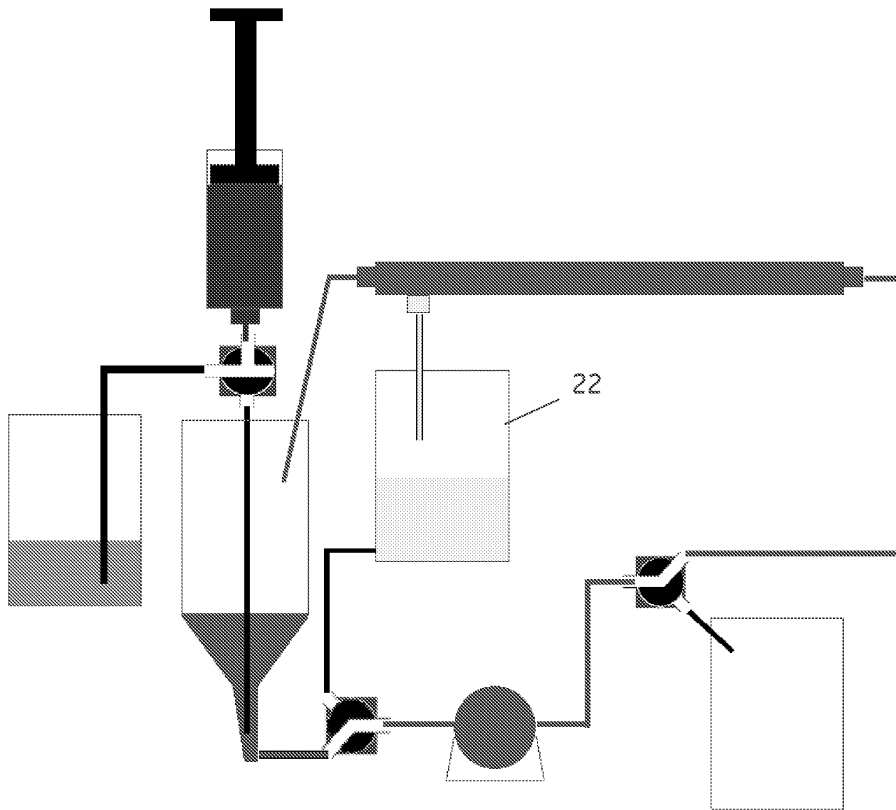
도면8



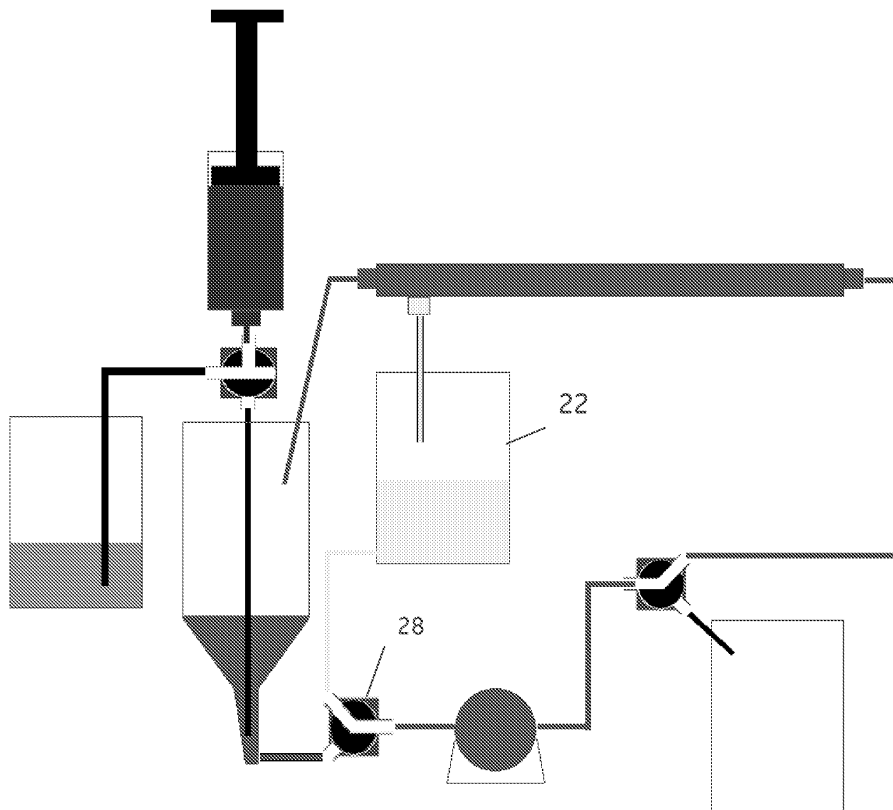
도면9



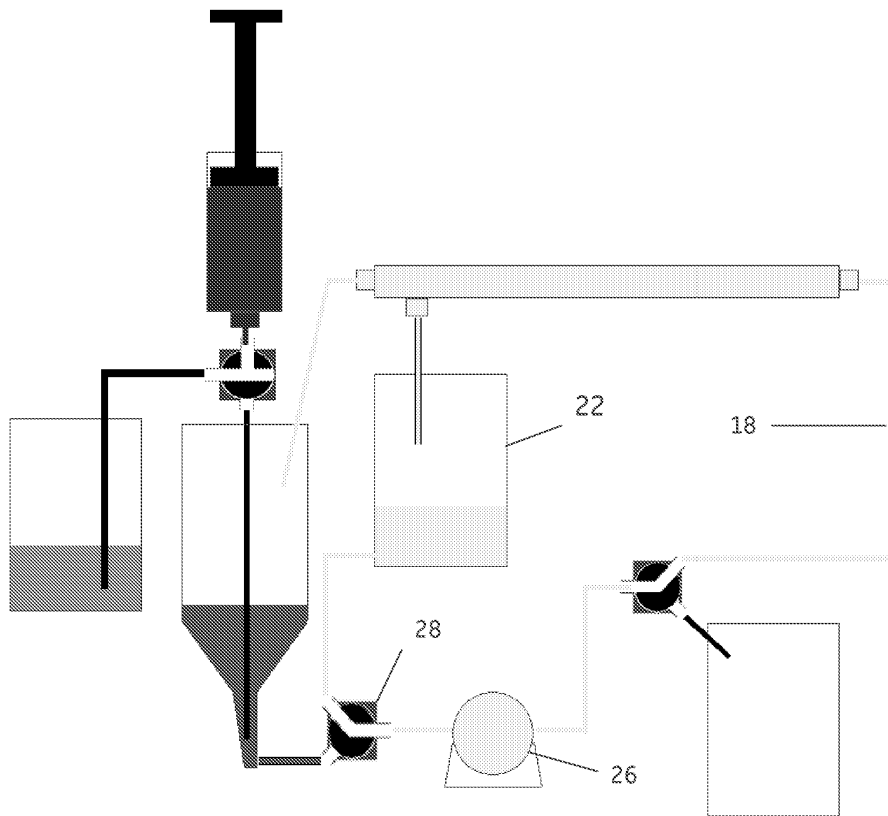
도면10



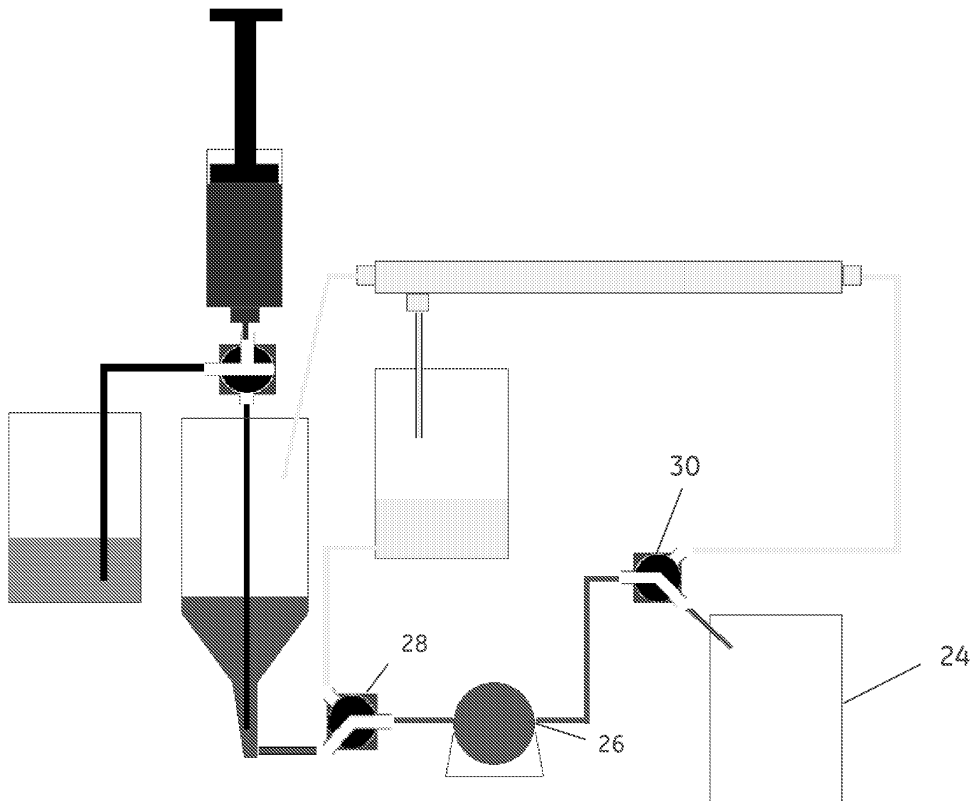
도면11



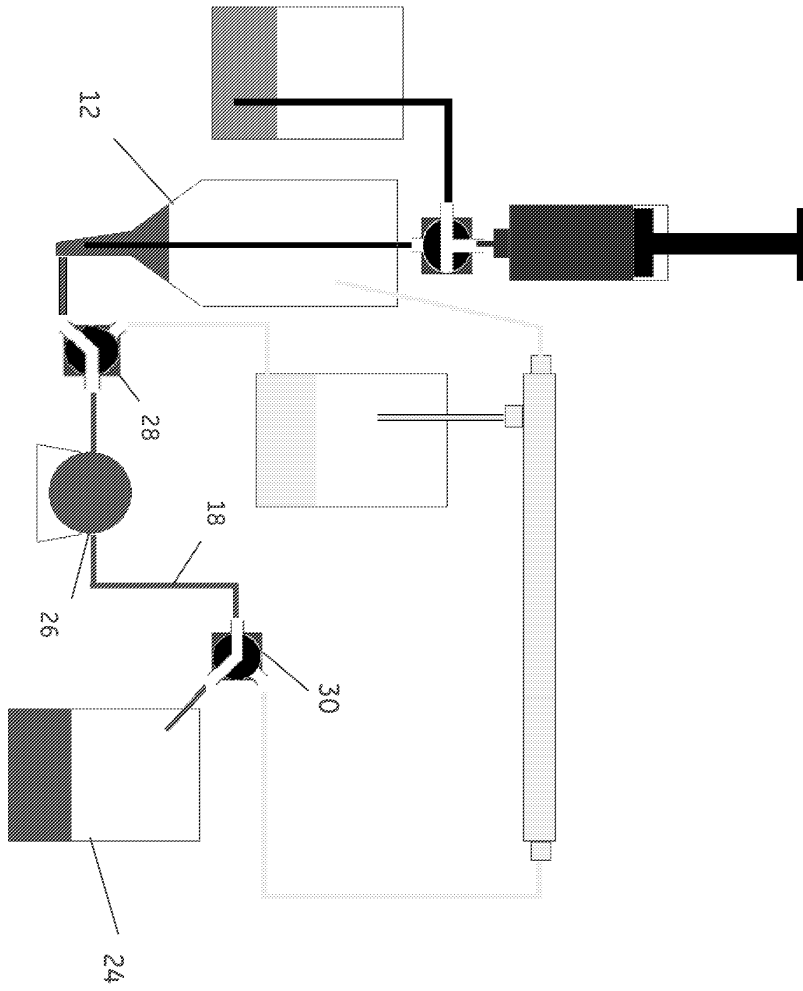
도면12



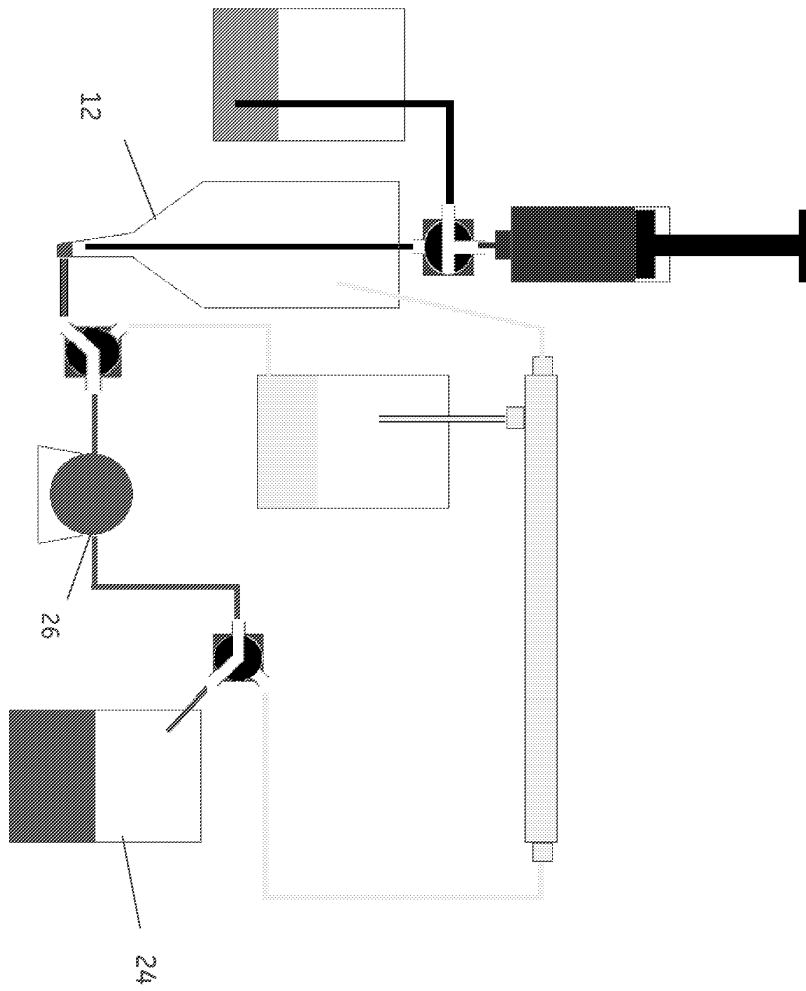
도면13



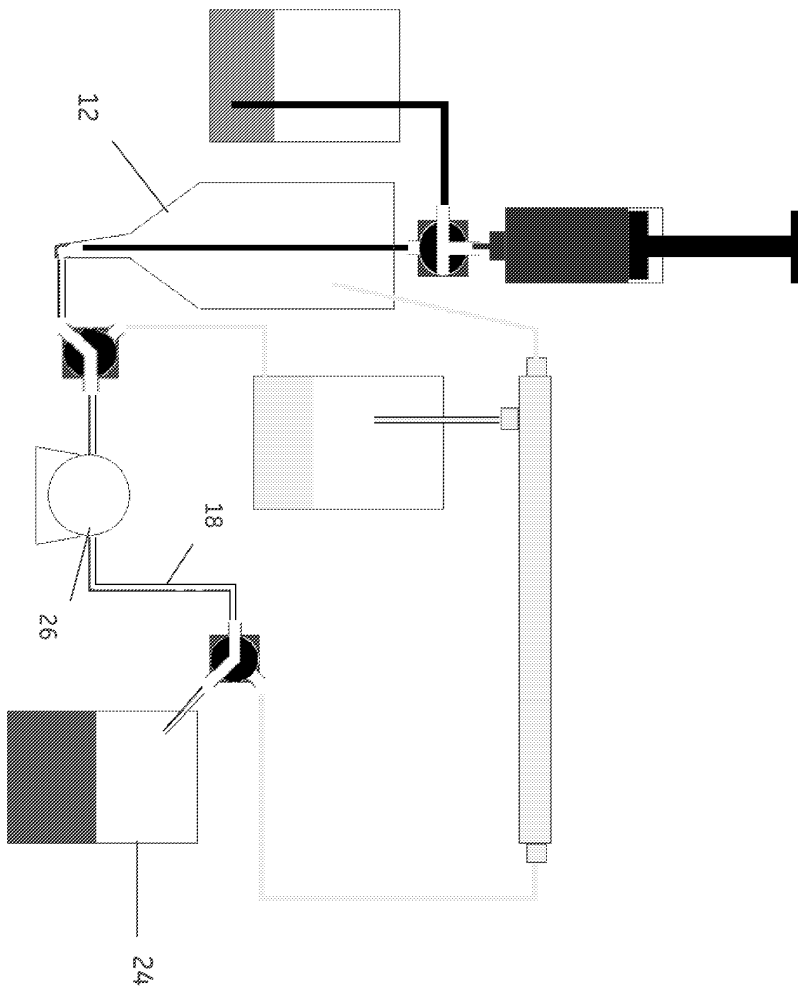
도면14



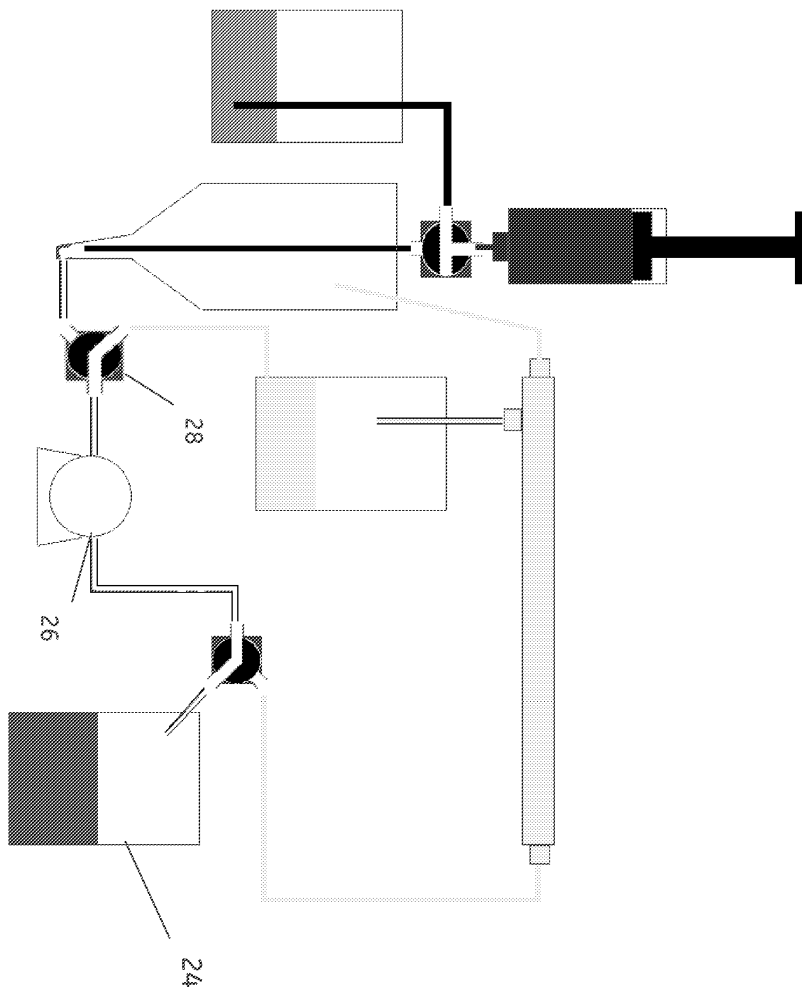
도면15



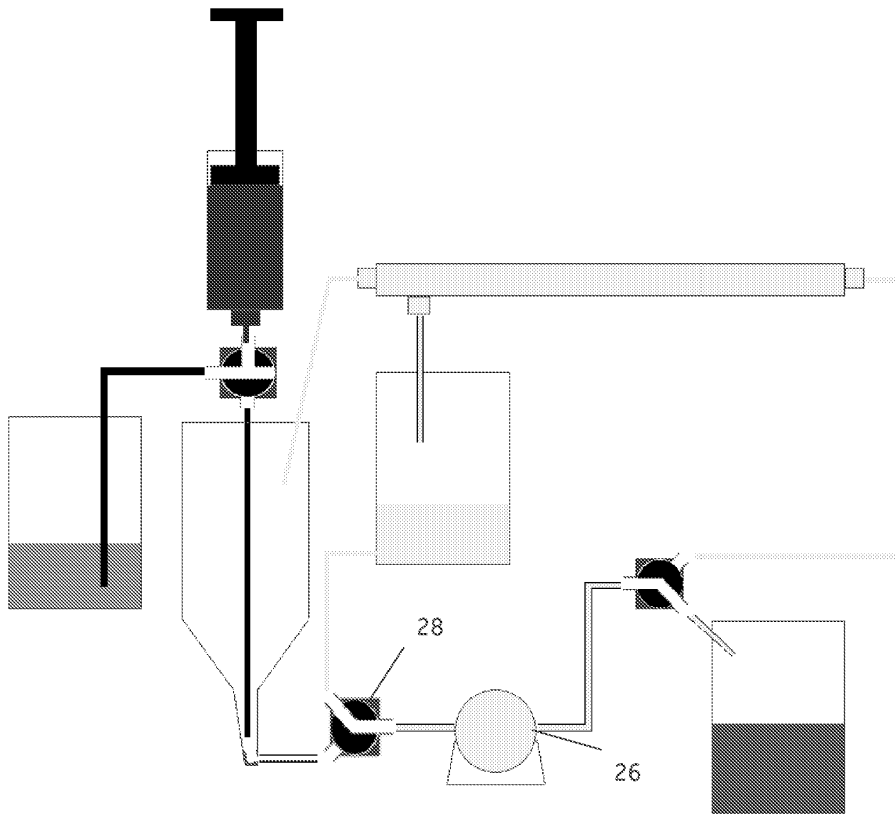
도면16



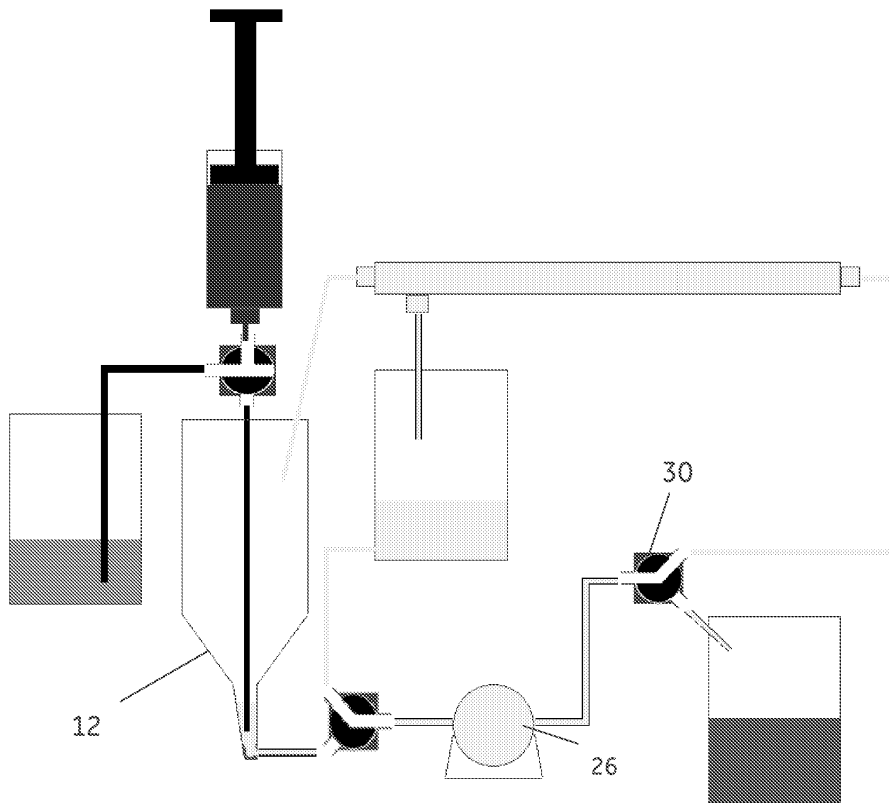
도면17



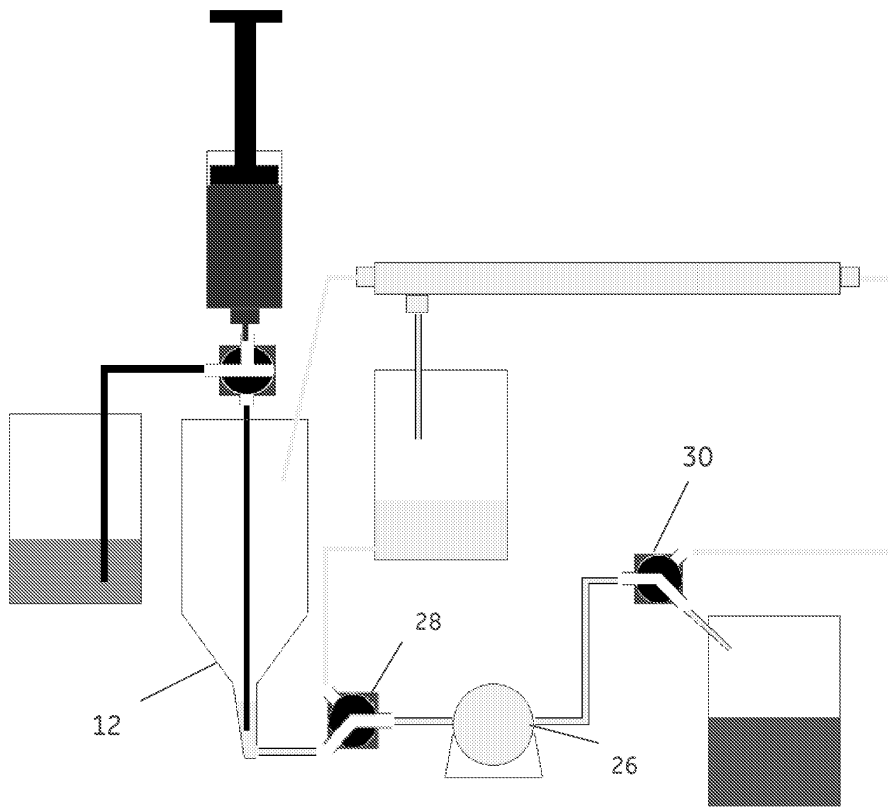
도면18

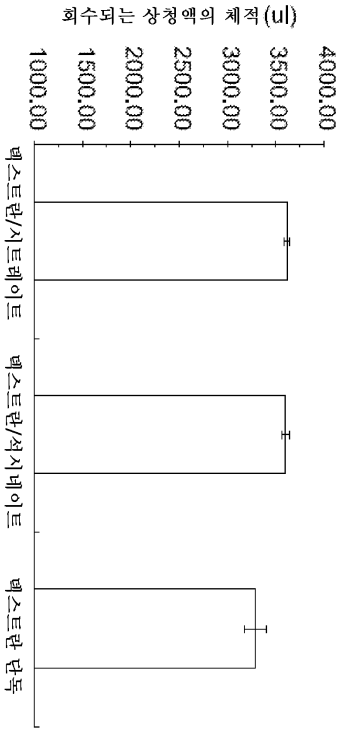


도면19



도면20

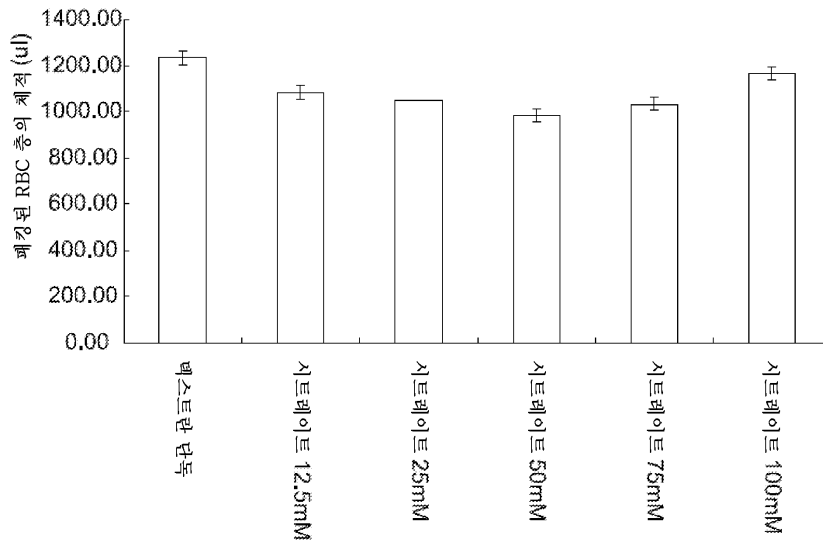




ID	샘플	회수된 상정액의 체적(마이크로리터)	평균 체적	표준 편차
1	테스트란/시트레이트	3650		
2	테스트란/시트레이트	3620		
3	테스트란/시트레이트	3600	3623.33	25.17
4	테스트란/적시네이트	3600		
5	테스트란/적시네이트	3650		
6	테스트란/적시네이트	3580	3610.00	36.06
7	테스트란 단독	3170		
8	테스트란 단독	3300		
9	테스트란 단독	3400	3290.00	115.33

도면21

도면22



ID	샘플	RBC 체적 (μl)	평균	표준편차
1	텍스트란 단독	1200.00		
2	텍스트란 단독	1250.00		
3	텍스트란 단독	1250.00	1233.33	28.87
4	시트레이트 12.5mM	1100.00		
5	시트레이트 12.5mM	1050.00		
6	시트레이트 12.5mM	1100.00	1083.33	28.87
7	시트레이트 25mM	1050.00		
8	시트레이트 25mM	1050.00		
9	시트레이트 25mM	1050.00	1050.00	0.00
10	시트레이트 50mM	1000.00		
11	시트레이트 50mM	1000.00		
12	시트레이트 50mM	950.00	983.33	28.87
13	시트레이트 75mM	1050.00		
14	시트레이트 75mM	1000.00		
15	시트레이트 75mM	1050.00	1033.33	28.87
16	시트레이트 100mM	1200.00		
17	시트레이트 100mM	1150.00		
18	시트레이트 100mM	1150.00	1166.67	28.87