



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년11월25일  
 (11) 등록번호 10-1332733  
 (24) 등록일자 2013년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 9/50 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)  
 A61K 31/6615 (2006.01) A61K 38/50 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2007-7004994  
 (22) 출원일자(국제) 2005년08월04일  
 심사청구일자 2010년07월16일  
 (85) 번역문제출일자 2007년02월28일  
 (65) 공개번호 10-2007-0058478  
 (43) 공개일자 2007년06월08일  
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2005/002323  
 (87) 국제공개번호 WO 2006/016247  
 국제공개일자 2006년02월16일  
 (30) 우선권주장  
 04 08667 2004년08월05일 프랑스(FR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 WO1993000940 A1  
 전체 청구항 수 : 총 31 항

(73) 특허권자  
 에리테코 파르마  
 프랑스 에프-69008 리옹 아브뉴 로크펠레 60  
 (72) 발명자  
 고드프랭, 얀느  
 프랑스 에프-69009 리옹 튀 에밀 뒤포르 5  
 (74) 대리인  
 리엔목특허법인

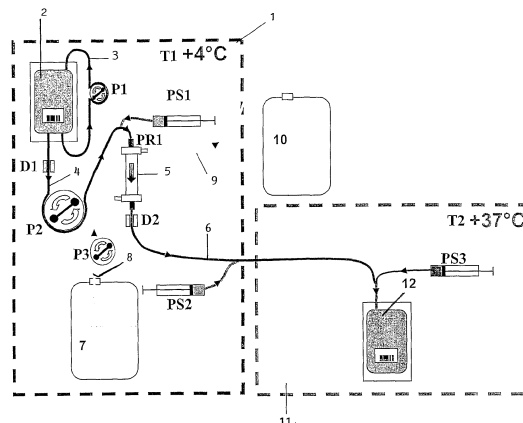
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 적혈구에 활성 성분을 내재화시키는 용해/재봉합 방법 및 장치

**(57) 요약**

활성 성분, 특히, 아스파라기나아제 또는 이노시톨 헥사포스페이트를 적혈구에 내재화하는 용해/재봉합 방법 및 장치가 개시된다. 활성 성분을 포함하는 적혈구를 제조하는 용해/재봉합 방법으로서, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다: (1) - +1 내지 +8℃로 냉장되고 65%와 동일하거나 또는 그 이상의 적혈구 용적율을 갖는 등장액에 현탁된 혈구 농축액을 넣는 단계, (2) - 상기 동일한 혈구 농축액으로부터의 적혈구 시료, 바람직하게는 상기 단계 (1)에서 수득된 현탁액의 시료에 대해 삼투압 취약성을 측정하는 단계, (3) - +1 내지 +8℃로 일정하게 유지되는 온도에서, 상기 동일한 챔버 내부에서 용해 및 상기 활성 성분의 내재화를 수행하는 단계로서, 65% 이상의 적혈구 용적율을 갖는 적혈구 현탁액 및 +1 내지 +8℃로 냉장된 저장성의 용해 용액을 투석 카트리지에서 순환시키는 단계를 포함하고; 상기 용해 파라미터는 상기 측정된 삼투압 취약성에 따라 조절하는 것인 단계; 및 (4) - 제2 챔버에서 고장액에 의해 +30 내지 +40℃의 온도에서 재봉합 절차를 수행하는 단계.

**대표도** - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

활성 성분을 내포하는 적혈구를 제조하는 용해 및 재봉합(reseal) 방법으로서, 상기 방법은:

- (1) 혈장으로부터 분리된 적혈구 농축액을 +1 내지 +8℃로 냉장된 등장액에 현탁시켜, 65% 이상의 적혈구 용적율(haematocrit level)을 갖는 적혈구 현탁액을 수득하는 단계,
  - (2) 상기 동일한 적혈구 농축액으로부터의 적혈구 시료의 삼투압 취약성(osmotic fragility)을 측정하는 단계,
  - (3) 상기 65% 이상의 적혈구 용적율을 갖는 적혈구 현탁액 및 +1 내지 +8℃로 냉장된 저장성 용해 용액을 투석 카트리지에서 순환시켜, 적혈구를 용해시켜 적혈구의 막이 활성 성분에 대해 투과성을 갖게 하고, 이에 의해 상기 활성 성분을 적혈구 내에 내포시키는 단계를 포함하고, 상기 투석 카트리지로 유입되는 적혈구 현탁액의 유속 및 용해 용액의 오스몰 농도 중 하나 이상인 용해 파라미터는 상기 측정된 삼투압 취약성에 따라 조절하는 것인, +1 내지 +8℃로 일정하게 유지되는 온도에서, 제1 챔버 내부에서 적혈구의 용해 및 상기 활성 성분의 적혈구로의 내재화(internalization)를 수행하는 단계; 및
  - (4) 제2 챔버에서 +30 내지 +40℃의 온도에서 상기 적혈구 현탁액에 대해 고장성인 고장액에 의해 상기 단계 (3)에서 수득된 적혈구를 재봉합시키는 절차를 수행하는 단계를 포함하고,
- 상기 단계 (1) 및 단계 (2)는 임의의 순서로 수행될 수 있는 것인 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 삼투압 취약성은 적혈구 시료의 삼투압 취약성이 15분 미만 내에 측정될 수 있도록 구성된 측정 장치에 의해 측정되고 수득된 결과는 상기 용해 파라미터를 조절하기 위해 단시간 내에 이용되는 것인 방법.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 삼투압 취약성은 반-투과성 막을 통해, 공지된 등장성을 갖는 저장액에 대해 측정된, 상기 적혈구 시료의 하나 이상의 용혈 파라미터에 의해 결정(characterize)되고, 상기 용혈 파라미터는 하기로부터 선택되는 것인 방법:

- a. 용혈(haemolysis)이 나타나는 배지의 오스몰 농도(osmolarity),
- b. 용혈의 속도 V,
- c. 주어진 오스몰 농도에서의 용혈의 백분율,
- d. 50% 용혈이 수득될 수 있게 하는 오스몰 농도, 및
- e. 주어진 백분율의 용혈을 수득하기까지의 시간.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 온도 제어가 제공되는 냉장 모듈이 이용되고, +1 내지 +8℃로 냉장된 적혈구 현탁액의 파우치가 상기 모듈에 배치되고, 투석 카트리지 및 상기 카트리지를 일면에서는 상기 파우치로, 다른 일면에서는 플라스크로 연결하는 튜브를 포함하는 멸균된 일회용의 제거가능한 조립체에 연결되어 있거나 연결되며, 상기 모듈은 상기 적혈구 현탁액과 상기 용해 용액의 순환을 일으킬 수 있는 수단을 더 포함하고, 상기 모듈의 내부에서 온도는 +1 내지 +8℃로 안정화되는 것인 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 용해 절차는 상기 파우치 내의 현탁액의 온도가 +1 내지 +8℃일 때 개시되는 것인 방법.

**청구항 7**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 현탁액에서 적혈구 용적율의 안정한 수준이 상기 투석 카트리지에서 상기 현탁액의 통과 시간 내내 유지되는 것인 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 외부 루프형 순환이 제공된 파우치가 이용되고, 상기 순환은 상기 현탁액의 상기 파우치로의 순환 및 상기 파우치로부터의 순환을 일으킬 수 있는 것인 방법.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제5항에 있어서, 상기 활성 성분은 상기 적혈구 현탁액의 파우치에 존재하거나 또는 상기 투석 카트리지를 통한 통과 전 또는 후, 또는 상기 투석 카트리지를 통한 통과 전 및 후에 상기 현탁액의 순환으로 도입되는 것인 방법.

**청구항 11**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 적혈구 농축액은 그의 삼투력을 증가 또는 균질화할 수 있는 용액으로 사전에 처리된 적혈구를 포함하는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단계 (1) 및 단계 (3) 동안 온도는 +2 내지 +6℃로 유지되는 것인 방법.

**청구항 13**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 활성 성분은 아스파라기나아제 및 이노시톨 헥사포스페이트로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 급성 림프모구성 백혈병 및 림프종을 치료하도록 의도된 아스파라기나아제를 내포하는 적혈구를 생성하거나, 또는 방사선요법 치료와 연관되어 저산소(hypoxic) 증상을 치료하거나 또는 겸상혈구증 또는 기타 저산소 상태를 치료하도록 의도된 이노시톨 헥사포스페이트를 내포하는 적혈구를 생성하기 위한 것인 방법.

**청구항 15**

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 삼투압 취약성은 상기 단계 (1)에서 수득된 현탁액의 시료에 대해 측정되는 것인 방법.

**청구항 16**

제1항 또는 제2항에 따라 활성 성분을 내포하는 적혈구를 제조하는 방법을 수행하기 위해 이용될 수 있는 용해 장치로서, 상기 장치는 냉각 수단이 제공된 모듈(1), 상기 모듈(1)에 배치되도록 배열되고 일면은 용해 용액용 유입구에 연결되고, 나머지 일면은 적혈구 현탁액용 유입구에 연결될 수 있는 투석 카트리지(5)를 포함하는 무균 상태의 일회용 제거가능한 조립체(2 내지 12)를 포함하고,

상기 모듈(1)에는 +1 내지 +8℃로 온도를 제어하는 수단 및 처리 대상인 적혈구의 삼투압 취약성에 따라, 상기 적혈구 현탁액의 상기 용해 카트리지를 통한 유속 및 상기 용해 용액의 오스몰 농도 중 하나 이상을 조절하는 수단이 제공되는 것을 특징으로 하는 것인 장치.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 제거가능한 조립체는 상기 적혈구 현탁액을 수용할 수 있는 파우치(2) 및 상기 파우치를 상기 투석 카트리지(5)에 연결하는 튜브(6)를 포함하고, 상기 모듈(1)은 상기 튜브(4)와 동시-작동하고 상기 적

혈구 현탁액이 상기 파우치(2)로부터 상기 카트리지(5)를 향해 및 상기 카트리지(5)를 통해 순환될 수 있게 하는 펌프(P2)를 포함하고, 상기 펌프(P2)는 선택적으로 유속을 조절하는 수단에 연결되는 것인 장치.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 파우치에는 양 말단에서 상기 파우치(2)에 연결되는 루프형 튜브(3)가 제공되고, 상기 모듈(1)은 상기 튜브(3)와 동시-작동하고 상기 파우치의 내용물을 상기 파우치의 내외부로 순환시킬 수 있는 펌프(P1)를 포함하는 것인 장치.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 활성 성분의 주입용 튜브는 상기 파우치(2)를 상기 투석 카트리지(5)의 적혈구 현탁액용 유입구에 연결하는 튜브(4)에 연결되고, 상기 카트리지(5)는 상기 용해 용액을 포함할 수 있는 플라스크(7)에 튜브(8)에 의해 연결되고, 상기 모듈(1)은 상기 플라스크(7)에 대한 수용 수단(receiving means) 및 상기 용해 용액을 상기 투석 카트리지를 향하여 및 이를 통하여 순환시키기 위해 튜브(8)와 동시-작동될 수 있는 펌프(P3)를 포함하고; 및 상기 투석 카트리지의 적혈구 현탁액용 유출구는 상기 모듈의 외부로 개방되거나, 또는 개방될 수 있는 튜브(6)에 연결되는 것인 장치.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 튜브(6)는 용해로부터 방출되는 적혈구 현탁액 및 재봉합 용액을 수집할 수 있는 제2 파우치(12)에 연결되고, 상기 파우치는 모듈의 온도를 +30 내지 +40°C로 조절할 수 있는 수단이 제공된 제2 모듈(11) 내에 배열되는 것인 장치.

**청구항 21**

제16항에 있어서, 작업자에 의해 입력된 지시 또는 작업자에 의해 입력된 데이터에 따라, 삼투압 취약성을 참조하여 용해 과정 및 선택적으로 재봉합 과정을 조절할 수 있는 전자적 수단(electronic means)을 포함하는 것인 장치.

**청구항 22**

제1항 또는 제2항에 따른 방법을 수행하기 위한 유연성 있는 플라스틱 소재의 일회용 조립체로서, 양 말단에 의해 파우치(2)에 연결된 루프형 튜브(3)가 제공된 파우치(2)를 포함하고, 상기 파우치(2)는 투석 카트리지(5)의 적혈구 현탁액용 유입구에 연결된 튜브(4)에 연결되고, 상기 투석 카트리지의 적혈구 현탁액용 유출구는 제2 파우치(12)에 연결된 튜브(6)에 연결되고, 하나 이상의 추가적인 튜브가 튜브(4) 또는 (6)에 개방되고, 상기 투석 카트리지는 용해 용액을 순환시키도록 의도된 두 개의 튜브(8 및 9)에 더 연결되고; 상기 튜브(6)는 제2 파우치(12)에 연결되고 이차 튜브가 상기 튜브(6)에 연결되는 것인 일회용 조립체.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 수득된 삼투압 취약성의 측정값은 상기 적혈구 시료의 채취 후 용해 절차가 단시간 내에 수행되도록 신속하게 이용되어, 상기 적혈구 시료의 채취와 용해의 개시 간의 시간 간격은 30분 이하인 것인 방법.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 시간 간격은 25분 이하인 것인 방법.

**청구항 25**

제23항에 있어서, 상기 시간 간격은 20분 이하인 것인 방법.

**청구항 26**

제2항에 있어서, 반-투과성 막을 사이에 두고 그 한쪽에는 평가 대상인 상기 적혈구 시료를 넣고 다른 한쪽에는 공지된 등장성을 갖는 저장액을 적합한 용량으로 넣을 수 있게 하여 NaCl 이온이 상기 저장액 쪽으로 확산되면서 적혈구의 완만한(slow) 용혈이 일어날 수 있게 하는 장치가 이용되고, 시간의 경과에 따른 용혈의 진행은 808 nm의 파장을 갖는 레이저 빔에 의한 투과도(transmittance)의 측정에 의해 추적되고, 광전지

(photoelectric cell)가 상기 적혈구 시료를 통해 투과되는 광의 변화를 측정하는 것인 방법.

**청구항 27**

제1항에 있어서, 상기 삼투압 취약성의 측정은 용혈을 위해 선택된 온도에서 적혈구 또는 적혈구를 포함하는 현탁액을 대상으로 수행되는 것인 방법.

**청구항 28**

제3항에 있어서, 상기 삼투압 취약성은 상기 파라미터 b 또는 d, 또는 b와 d에 의해 결정되는 것인 방법.

**청구항 29**

제14항에 있어서, 상기 단계 (1)에서 수득된 현탁액이 상기 활성 성분을 포함하는 것인 방법.

**청구항 30**

제3항에 있어서, 상기 파라미터 d를 측정하고, 상기 투석 카트리지로 유입되는 적혈구 현탁액의 유속을 측정된 파라미터 d에 따라 조정하는 것인 방법.

**청구항 31**

제1항에 있어서, 상기 용해는 상기 적혈구 현탁액의 온도가 +1 내지 +8℃이고, 삼투압 취약성이 측정되었고 용해 파라미터가 기록되었을 때 개시되는 것인 방법.

**청구항 32**

제1항에 있어서, 상기 용해 용액은 일정한 유속으로 투석 카트리지를 통과하는 것인 방법.

**청구항 33**

제12항에 있어서, 상기 단계 (1) 및 단계 (3) 동안 온도는 +4℃로 유지되는 것인 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 활성 성분이 적혈구에 내재화(incorporate)될 수 있게 하는 소위 용해/재봉합(lysis/resealing) 기법이 수행될 수 있게 하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그 방법을 수행할 수 있는 장치에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 또한 아스파라기나아제 또는 그 등가물 또는 이노시톨 핵사포스페이트를 포함하고, 본 발명에 따른 방법을 수행하여 수득될 수 있는 적혈구 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0003] 용해/재봉합 기법은 유럽특허 EP-A-101 341 및 EP-A-679 101에서 개시된다. 후자는 먼저 투석 카트리지, 튜브, 시케인 형(chicane type) 또는 사형 파우치(serpentine pouch) 및 예를 들면, 사형 냉각 배열(serpentine cooling arrangement)과 같은 제거가능한 금속 요소를 비롯한 1회용 요소(single-use element)를 포함하는 조립체가 배치되는 용해 구획(lysis portion)을 위한 냉장 하우징, 및 둘째로, 재가열 수단이 제공되고 플라스틱 소재의 1회용 조립체가 배치된 재봉합용 하우징을 포함하는 비교적 복잡한 장치(installation)를 기재한다.

[0004] 사전에 혈장으로부터 분리되고 (저장성의 배지에서) 약한 이온력(ionic force)의 작용을 받은 적혈구는 그 막이 이온 및 거대분자들에 대해 투과성을 갖는 임계 부피(critical volume)에 도달할 때까지 팽창된다. 적혈구 막을 현미경 하에서 관찰하면 20 내지 500 nm의 세공(pore)이 나타나고, 그 결과 이를 통해 헤모글로빈이 새어 나갈 수 있다(P. Seeman J. Cell. Biol. 1967, 32(1): 55-70). 현탁 매질의 등장성을 회복시키면 세공이 폐쇄되어 막이 거대분자에 대해 불투과성이 된다. 이온에 대한 투과성만이 유지된다.

[0005] 저장성 쇼크(hypotonic shock)는 적혈구를 투석기, 바람직하게는 공동의 섬유(hollow fiber)를 갖는 《혈액》 구획(compartment)에서 순환시키고 저장액을 《투석액(dialysate)》 구획에서 역-류(counter current)로 순환시키는 것에 의해 발생시킨다. 이 기법의 장점은 저장성 쇼크 동안 적혈구를 감금하여 그 세포들의 생명에 필수

적인 구성성분들의 손실이 상당히 감소될 수 있게 한다는 것이다. 따라서, 적혈구의 반감기는 체내에서 유의성 있게 변화되지 않는다.

- [0006] 리포솜 또는 미세소포(microsphere) 내의 캡슐화와 같은 다른 기법들에 비해, 적혈구를 약제의 비히클로 사용하는 장점은 실질적으로 혈구들은 <<천연의>> 생체적합성(biocompatibility)를 가지며 공지된 방법에 의해 완전히 생분해가능하고 비교적 긴 생체내 기대 수명(약 120일)을 가지며 다양한 화학 분자 및 치료용 분자가 그 내부에 캡슐화될 수 있다는 사실에 있다.
- [0007] 적혈구의 용해 및 재봉합에 의한 내재화(internalization) 방법은 복잡한 다-인자 현상이다. 결과의 변이에 영향을 미치는 일부 유의성 있는 물리적/화학적 파라미터는 투석 전 헤모글로빈의 농도, 투석기 내의 적혈구 현탁액의 유속, 저장성 투석의 완충용액의 오스몰 농도(osmolality), 투석 온도 및 재봉합 온도 및 투석기의 막 내 외부의 압력(trans-membranous pressure)이다. 적혈구의 삼투압 취약성( osmotic fragility)은 혈액 시료 간에 상이하고 주요한 생물학적 인자일 수 있다. 따라서, L. Boucher et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 1996, 24, 73-78은 적혈구의 다양한 모집단의 삼투압 취약성의 변이가 이노시톨 헥사포스페이트의 분포 및 최종 농도에 대해 갖는 영향을 연구하였다. 결론적으로, 상기 저자들은 적혈구의 초기 삼투압 취약성이 용해의 정도와 활성 성분의 내재화에서의 변이에서 주된 역할을 수행하고 그 삼투압 취약성은 적혈구의 투과성, 표면적/부피와 이온 함량 간의 관계, 공여자의 생리적 상태 및 연령(또한 A.A. Hussain et al., Br. J. Haematol. 1984, 57(4): 716-718 참조), 혈액 보관 기간, 약제, 질병(또한 K. Kolanjiappan et al., Clin. Chim. Acta 2002, 326(1-2): 143-149 참조) 및 치료제의 존재와 같은 다수의 인자들에 의존적이라는 것을 시사한다. 적혈구 현탁액의 유속이 변화하도록 하여 수득된 결과들은 12 내지 14 ml/분 유속에서 운영 조건은 적혈구가 저 수준의 취약성을 갖는 군 또는 고 수준의 취약성을 갖는 군에 속하는지 여부에 따라 극심한 민감도를 보인다는 것을 입증했다.
- [0008] 따라서, 그와 같은 문헌들은 적혈구의 삼투압 취약성 및 용해/재봉합 기법에 의한 내재화(incorporation)의 효과에 영향을 미치는 다양한 인자들에 대한 초기 정보를 제공한다. 그들은 실제로 직면하게 되는 어려움을 이룰 수 있게 하고, 이는 그 기법이 인간의 의료에 일상적으로 적용될 수 없다는 것을 설명한다.
- [0009] 최근의 발표는 현재의 상황을 매우 잘 정리한다. C. G. Millan 등은 Journal of Controlled Release 2004, 95: 27-49에서 적혈구의 약학적 비히클로서의 용도에 관한 전반적인 개관을 발표하고, 이에 의하면 저자들은 적혈구의 약학적 비히클로서의 용도가 인간을 대상으로 한 의약부문에서 흥미로운 대상임에도 불구하고, 보관의 어려움, 오염의 위험 및 그 제조를 가능하게 하는 입증된 양산(industrial) 절차의 부재 때문에 그의 개발은 현재 매우 제한적인 것으로 결론짓는다.
- [0010] 아스파라기나아제는 세포 생명, 특히, 섬유아세포의 생명에 필수적인 단백질의 합성에 없어서는 안 되는 아미노산인 아스파라긴을 가수분해하고 고갈시키는 세균성 미생물(대장균 또는 에르위니아)로부터 생산되는 효소이다. 일부 암 림프모구(cancerous lymphoblastic cell)들은 정상 세포들과 달리, 스스로 아스파라긴을 합성할 수 있는 능력을 갖지 않으며 세포의 공급원(source)에 의존적이다. 따라서, 아스파라기나아제에 의한 처리는 그들로부터 그 구성성분을 결핍시켜 그들의 사망을 초래한다. 이 세포분열 저지 활성 (antimitotic)은 종양 세포에 대해 선택적이다.
- [0011] 그러나, 인간에서 본래의 아스파라기나아제(native asparaginase)는 평균적으로 70%를 초과하는 비율의 환자에 존재하는 항체의 생성을 유도하여, 아스파라기나아제의 제거 및 때때로 매우 심각한 과민 반응의 증가를 초래한다(B. Wang et al., Leukaemia 2003 17,8: 1583-1588). 따라서, 아스파라기나아제가 급성 림프모세포성 백혈병(acute lymphoblastic leukaemia)의 치료에 매우 효과적이거나, 매우 유독하고 우르티케어리(urticary) 형의 단순한 반응에서 완전한 아나필락틱(anaphylactic) 쇼크까지의 과민증(hypersensitivity) 반응들을 유도할 수 있다. 또한, 신경학적 유형(의식 교란), 울혈형(haemostatic type)(저섬유소원혈증, 출혈 및/또는 혈전성 합병증을 유발하는 항-트롬빈 III 및 기타 응고 인자의 혈청 수준 감소), 위-장형(gastro-intestinal type) 및 췌장형(췌장의 급성 염증 포함)의 관찰된 해로운 효과들이 있다.
- [0012] 아스파라기나아제의 적혈구로의 캡슐화는 치료 지수(therapeutic index)가 개선될 수 있게 한다(D. Schrijvers et al., Clin. Pharmacokinet. 2003, 42(9): 779-791). 따라서, 아스파라기나아제가 재현가능하고 공업적인 방식으로 적혈구에 캡슐화될 수 있게 하는 방법을 제공하는 것은 매우 유용할 것이다.
- [0013] 또한, 이노시톨 헥사포스페이트가 헤모글로빈에 대한 산소의 친화도를 유의성 있게 감소시키고 조직에서의 산소의 해리를 증가시키기 위해 적혈구에서 2,3-DPG(2,3-디스포스글리세레이트)의 대용물로서 제안되었다(EP-A-0



101 341). 미국특허 제4,321,259호, 미국특허 제5,612,207호 및 미국특허 제6,610,702호는 적혈구에서 그 대용물의 내재화 및 다양한 치료적 응용에서의 그의 용도를 기재한다. 그들은 저산소 증양의 산소화(oxgenation) 및 그들의 방사선요법에 대한 민감도를 개선하기 위해 방사선 요법에 의한 암 치료를 위한 첨가물로서의 용도를 포함한다.

[0014] 캡슐화를 위해, 미국특허 제4,321,259호는 적혈구와 이노시톨 헥사포스페이트를 포함하는 리포솜 간의 융합을 이용한다. 미국특허 제5,612,207호는 전기천공법(electroporation)을 이용한다. 미국특허 제6,610,702호는 적혈구로의 도입을 촉진할 수 있는 생적합성인 수용성 복합체(biocompatible hydrosoluble complex)를 형성하기 위해 암모늄 양이온과 결합된 이노시톨 헥사포스페이트에 의한 전기천공법의 개선을 개시한다. 마지막으로, 전술된 Biotechnol. Appl. Biochem. 1996, 24, 73-78에서, L. Boucher 등은 용해/재봉합 기법에 의한 적혈구로의 이노시톨 헥사포스페이트의 도입을 연구한다. 따라서, 그 화합물을 적혈구로 도입하기 위한 다양한 경로들이 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 이용될 수 있다. C.G. Millan 등(전술)이 기재한 바와 같이, 일반적으로 산소의 수송에 대해 이노시톨 포스페이트를 언급할 때, 그러나, 이노시톨 헥사포스페이트와 같은 분자를 내재화하는 적혈구의 이용은 현재 입증된 공업적 절차의 부재에 직면한다. 본 출원에서, 따라서, 이노시톨 헥사포스페이트를 재현가능하고 공업적인 방식으로 적혈구에 캡슐화될 수 있게 하는 방법을 갖는 것은 매우 유리할 것이다.

**발명의 상세한 설명**

[0015] 전술된 바를 고려할 때, 본 출원인이 해결하고자 하는 문제는 재현가능한 방식으로 원하는 양의 활성제를 내포하는 적혈구가 생성될 수 있게 하고 혈액 수혈에 대한 기준(무균성(sterility), 병원균 및 발열원의 부재)을 준수하는 제품이 수득될 수 있게 하는 공업적 용해/재봉합 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 중요한 목적은 수혈을 위해 요구되는 기준을 준수하는 혈구 농축액(globular concentrate)에 적용될 수 있는 그와 같은 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 또 다른 목적은 아스파라기나아제 또는 이노시톨 헥사포스페이트가 효과적이고, 재현가능하며, 신뢰할 수 있고 안정된 방식으로 적혈구에 캡슐화될 수 있게 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 이 목적들 및 기타 목적들이 하나 이상의 활성 성분을 포함하는 적혈구를 제조하는 용해/재봉합 방법에 의해 달성되고, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함한다:

[0019] 1 -+1 내지 +8℃로 냉장되고 65% 이상의 적혈구 용적율(haematocrit level)을 갖는 등장액 중 현탁액으로 혈구 농축액을 현탁시키는 단계,

[0020] 2 - 상기 동일한 혈구 농축액으로부터의 적혈구 시료에 대한 삼투압 취약성을 측정하는 단계로, 상기 단계 1 및 단계 2는 임의의 순서(병행 포함)로 수행될 수 있으며,

[0021] 3 - +1 내지 +8℃에서 냉장된 저장성 용해 용액(hypotonic lysis solution) 및 65% 또는 그 이상의 적혈구 용적율을 갖는 적혈구 현탁액을 투석 카트리지에서 순환되게 하는 단계를 포함하며; 용해 파라미터는 사전에 측정된 삼투압 취약성에 따라 조절되는 것인 +1 내지 +8℃에서 일정하게 유지되는 온도에서 상기 동일한 챔버 내에서 상기 활성 성분의 용해 및 내재화 절차를 수행하는 단계; 및

[0022] 4 - 온도가 재봉합(resealing)에 적응되고, 바람직하게는 +30 내지 +40℃로 적응된 제2챔버에서 고장액의 존재 하에 재봉합이 수행되는 단계.

[0023] 바람직한 구체예에서, 단계 2는 단계 1에서 준비된 현탁액의 시료에 대해 수행된다. 하기에서 설명되는 바와 같이, 현탁액은 염수에 의한 세척과 같은 통상적인 처리 작업을 거친 혈구 농축액(globular concentrate)으로부터 제조될 수 있다. 또한, 내재화될 활성 성분이 이 현탁액에 존재할 수 있다. 따라서, 이 현탁액의 시료에 대해 단계 2를 수행하는 것이 유리하고, 그 활성 성분이 초기 현탁액에 존재하는 경우, 단계 2는 그 활성 성분을 포함하는 시료에 대해 수행된다.

[0024] <<내재화(internalization)>>라는 용어는 적혈구 내부로의 활성 성분의 도입을 의미하도록 의도된다.

[0025] 본 발명의 일 특징에 따르면, 혈구 농축액이 65% 또는 그 이상, 바람직하게는 70% 또는 그 이상의 높은 적혈구 용적율로 등장액에 현탁되고, 그 현탁액은 +1 내지 +8 ℃, 바람직하게는 +2 내지 +6℃, 통상적으로 +4℃ 수준으로 냉장된다. 특정한 방법에 따르면, 적혈구 용적율 수준은 65 내지 80%, 바람직하게는 70 내지 80% 이다.

[0026] 본 발명의 중요한 특징에 따르면, 삼투압 취약성(osmotic fragility)은 용해 단계 직전에 적혈구를 기준으로 측

정된다. 적혈구 또는 적혈구를 포함하는 현탁액은 유리하게는 용해를 위해 선택된 온도와 동일하거나 또는 그 부근의 온도로 유지된다. 본 발명의 또 다른 유리한 특징에 따르면, 수득된 삼투압 취약성의 측정값은 신속하게 이용되며, 즉, 용해 절차가 시료가 채취된 후 단시간 내에 수행된다. 바람직하게는 시료 채취와 용해의 개시 간의 시간 간격은 30분 이하이고, 훨씬 더 바람직하게는 25분 이하, 또는 20분이다.

[0027] 투석이 제어될 수 있게 하는 두 개의 파라미터는 세포들이 투석기에 존재하는 시간(그의 특징에 따라) 및 투석액의 오스몰 농도(osmolarity)이다. 그 두 파라미터는 용해/재조합 단계에 적용되기 위해 처리된 적혈구의 삼투력(osmotic strength) 또는 역으로 삼투압 취약성의 특징에 따라 조절되어야 한다. 삼투력은 하나 이상의 하기의 파라미터에 의해 그 특징이 규명될 수 있다:

[0028] a. 용혈(haemolysis), 즉, 세공 형성의 개시가 나타나는 배지의 오스몰 농도.

[0029] b. 용혈 % = f (배지의 오스몰 농도) 곡선의 선형 부분의 기울기에 의해 정해지는, 용혈의 속도 V.

[0030] c. 주어진 오스몰 농도에서의 용혈의 백분율.

[0031] d. 50% 용혈(H<sub>50</sub>)이 수득될 수 있게 하는 오스몰 농도.

[0032] e. 주어진 용혈의 백분율(예를 들면 50%)를 수득하기까지의 시간.

[0033] 바람직한 구체예에 따르면, 삼투압은 파라미터 b, d, 또는 b 및 d에 의해 그 특징이 규명된다.

[0034] 따라서, 삼투압 취약성은 단시간 내에 측정되어야 하고, 이는 시료의 채취와 용해의 개시 사이의 짧은 시간 간격과 조화된다. 본 발명의 일 특징에 따르면, 알려진 등장성을 갖는 저장액, 예를 들면, 물(증류수 또는 그 등가물)에 대해 반투과성 막을 통해 하나 이상의 그와 같은 용혈 파라미터들이 측정된다. 수동적인 방법이 고려될 수 있다. 그러나, 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 삼투압 취약성은 적혈구 시료의 삼투압 취약성을 15분 미만, 보다 상세하게는 12분 미만, 및 바람직하게는 10분 미만의 시간 내에 측정하도록 구성된 자동 측정 장치에 의해 측정되고, 수득된 결과는 용해 파라미터를 조절하고 용해를 개시하기 위해 단시간 내에 이용된다.

[0035] 삼투압 취약성의 측정은 J.V. Dacie in Practical Haematology, 2<sup>nd</sup> edn, Churchill, London 1956에 의해 기재된 수동 기법을 부분적으로 자동화한 장치에 의해 수행될 수 있다. 그와 같은 장치의 일 예가 J. Didelon et al., Clinical Hemorheology and Microcirculation 23 (2000) 31-42에 의한 문헌에 기재된다. 원리는 반-투과성 막을 사이에 두고 그 한쪽에는 평가 대상인 적혈구 현탁액의 시료를 넣고 다른 한쪽에는 공지된 등장성을 갖는 저장액, 예를 들면, 증류수를 적합한 용량으로 넣을 수 있게 하여 NaCl 이온이 상기 용액, 예를 들면, 증류수 쪽으로 확산되면서 적혈구의 완만한(slow) 용혈이 일어날 수 있게 하는 장치의 이용에 기초한다. 시간의 경과에 따른 용혈의 진행은 808 nm의 파장을 갖는 레이저 빔에 의한 투과도(transmittance)(또한, J. Didelon et al., Biorheology 37, 2000: 409-416 참조)의 측정에 의해 관찰한다. 광전지(photoelectric cell)가 현탁액을 통해 투과되는 광의 변화를 측정한다. 예를 들면, 그 측정은 10분에 걸쳐 수행된다. 그 장치는 전술된 a 내지 e 중 하나 이상의 파라미터가 수득될 수 있게 한다.

[0036] 제1 방법에 따르면, 삼투압 취약성의 측정은 초기 온도가 +1 내지 +8°C인 시료에 대해 바람직하게는 동일한 온도에 있는 증류수로, 온도의 변화가 그 측정에 유해하지 않을 조건 하에서 수행된다. 제2 방법에 따르면, 삼투압 취약성의 측정은 +1 내지 +8°C의 온도에서 유지되는 시료에 대해 수행된다. 따라서, J. Didelon 등에 기재된 측정 장치는 온도가 제어될 수 있도록 변형될 수 있다. 바람직하게는, 이 온도는 용해 온도와 유사하거나 또는 동일하다.

[0037] 하나 이상의 전술된 파라미터들이 결정되면, <<활성(active)>> 물질을 캡슐화하는 적혈구 및/또는 그의 양을 수득하기에 충분한, 투석기 내에서 세포의 유속 또는 투석액의 오스몰 농도를 정하기 위해 그 파라미터(들)을 고려한 관계가 적용될 수 있다:

[0038] 적혈구의 유속 = [A x (H<sub>50</sub>)] + [B x (V)] + K

[0039] - A 및 B = 투석기 및 용해 용액의 오스몰 농도에 따라 조절가능한 변수

[0040] - K = 조절 상수(adjustment constant).

[0041] 투석액의 오스몰 농도 = [C x (H<sub>50</sub>)] + [D x (V)] + K

[0042] - C 및 D = 투석기 및 투석기 내의 적혈구의 유속에 따라 조절가능한 변수



- [0043] - K = 조절 상수.
- [0044] 바람직한 구체예에 따르면, 약 50% 용혈을 일으키는 NaCl의 농도(g/L)가 측정되고(파라미터 d) 투석 카트리지의 내의 적혈구 현탁액의 유속은 그 측정된 농도 값에 따라 조절된다.
- [0045] 본 발명의 일 양태에 따르면, 적혈구 현탁액의 온도가 +1 내지 +8℃일 때, 용해 절차가 개시되고, 삼투압 취약성을 측정하고 용해 파라미터를 기록하였다.
- [0046] 유리한 특징에 따르면, 처리될 초기 현탁액을 전술된 용해/내재화 챔버에 배치한다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 방법은 온도 제어가 제공되는 냉장 모듈, 상기 모듈에 배치되고 투석 카트리지를 포함하는 멸균된 일회용의 제거가능한 조립체에 연결되거나 연결될 +1 내지 +8℃로 냉장된 적혈구 현탁액의 파우치, 일면은 상기 파우치로, 다른 일면은 용해 용액으로 상기 카트리지를 연결하는 튜브를 이용하고, 상기 모듈은 온도가 +1 내지 +8℃에서 안정화된 상기 모듈 내에서 상기 적혈구 현탁액과 상기 용해 용액의 순환을 일으킬 수 있게 하는 수단을 더 포함한다. 상기 냉장 모듈은 상기 파우치 및 상기 제거가능한 일회용 조립체를 수용할 수 있는 치수를 갖는다. 다양한 튜브에 의해 연결된 파우치, 투석 카트리지, 용해 용액이 이 유형의 단일의 냉장 모듈 내에 제공된다는 사실은 본 발명에 따른 방법의 유리한 특징이다.
- [0047] <<파우치(pouch)>>라는 용어는 수혈 및 혈액 유도체 분야에서 통상적으로 이용되는 유연성 있는(flexible) 파우치를 의미한다.
- [0048] 본 발명의 중요한 양태에 따르면, 투석기를 통과하는 현탁액의 적혈구 용적을 안정하게 유지하기 위해 적혈구가 파우치 내에서 균일한 현탁액으로 존재하게 하기 위한 단계들이 취해진다. 본 발명의 일 특징에 따르면, 파우치에는 따라서 파우치의 내외부로 현탁액을 순환시킬 수 있는 외부 루프(external loop)형 순환이 제공된다.
- [0049] 투석 카트리지(dialysis cartridge)라는 용어는 투석 벽(dialysis wall)에 의해 분리된 두 개의 구획(compartment)을 포함하고, 상기 투석 벽을 통해 한쪽 구획에 위치한 수용액의 삼투압이 제어되는 방식으로 변형될 수 있게 하고, 상기 수용액은 나머지 구획으로 도입될 염을 포함하는 것인 요소(element)를 의미하도록 의도된다. 이 유형의 카트리지는 의학 분야에서 널리 이용되고 있다. 바람직한 일 방법에 따르면, 공동의 섬유(hollow fiber)를 가진 투석 카트리지가 이용되고, 예를 들면, 이 유형의 카트리지는 하기의 구체적인 특징들을 갖는다: 100 내지 400 $\mu$ m의 섬유 내경(internal diameter), 0.3 내지 2 m<sup>2</sup>의 섬유의 총 외부 표면적, 10 내지 40 cm의 섬유 길이, 1.5 내지 8 ml/h.mmHg의 한외-여과 계수(ultra-filtration coefficient).
- [0050] 앞서 상술된 바와 같이, 용해 절차는 파우치 내의 현탁액의 온도가 +1 내지 +8℃일 때 개시될 수 있다. 하나의 유리한 방법에 따르면, 현탁액의 온도는 외부 루프형 순환에 위치한 센서에 의해 제어된다.
- [0051] 검출된 삼투압 취약성에 따르면, 두 개의 주요한 파라미터, 투석 카트리지 내에서 적혈구 현탁액의 유속 및 용해 용액의 오스몰 농도가 조절될 수 있고, 양 경우 모두에서, 용해 용액에 대한 일정한 유속을 고정하는 것이 바람직하다는 것을 고려할 때, 그러하다. 유속의 값은 결정적으로 중요한 것은 아니다. 통상적으로, 공동의 섬유를 갖는 투석 카트리지의 경우, 전술된 바와 같이, 용해 용액의 유속은 50 내지 300 ml/분, 바람직하게는 150 내지 250 ml/분으로 고정된다.
- [0052] 용해 용액은 적혈구의 현탁액에 대해 저장성인 염수이다. 용해 용액의 오스몰 농도가 일정한 값으로 고정되는 경우, 그 오스몰 농도는 통상적으로 20 내지 120 mOsm, 바람직하게는 70 내지 110 mOsm, 예를 들면, 90 mOsm일 수 있다.
- [0053] 예로서, 용해 용액은 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및/또는 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 글루코오스와 같은 당을 포함할 수 있다.
- [0054] 제1 방법에 따르면, 투석 카트리지를 통한 적혈구 현탁액의 유속은 조절되고, 반면에 용해용 완충액(lysis buffer)의 유속 및 오스몰 농도는 고정된다. 삼투압 취약성이 높을수록, 현탁액의 유속이 증가된다. 통상적으로, 그 규격(specification)이 전술된 바와 같은 카트리지의 경우, 유속은 5 내지 200 ml/분, 바람직하게는 10 내지 40 ml/분의 범위 내에서 변하게 될 것이다.
- [0055] 제2 방법에 따르면, 용해 용액의 오스몰 농도는 조절되고, 반면에 현탁액 및 용해 용액의 유속은 고정된다. 삼투압 취약성이 높을수록, 용해 용액의 오스몰 농도가 보다 많이 증가된다. 통상적으로, 오스몰 농도는 10 내지 200 mOsm/l, 바람직하게는 20 내지 150 mOsm/l의 범위 내에서 변하게 될 것이다.

- [0056] 제3 방법에 따르면, 투석 카트리지를 통한 적혈구 현탁액의 유속 및 용해 용액의 오스몰 농도가 모두 조절된다.
- [0057] 본 발명에 따르면, 적혈구 내에 내포되도록 의도된 하나 이상의 활성 성분을 도입한다. 활성 성분은 현탁액 파우치에 존재할 수 있고 및/또는 바람직하게는 점진적으로, 투석 카트리지의 상류 또는 하류의 현탁액 순환으로 도입될 수 있다. 도입될 부피는 작기 때문에, 활성 성분의 농도는 선택적이다.
- [0058] 적혈구의 현탁액은 바람직하게는 수용자(recipient)와 적합한 혈액형으로부터의 혈구 농축액(globular concentrate)으로부터 제조되고, 백혈구는 제거되었으며, 병원균은 전혀 검출되지 않았고, 특히 파우치, 예를 들면, 500 ml를 포함하는 파우치로 제공된다. <이식편/숙주(transplant/host)> 형의 면역반응을 경험할 수 있는 중증의 면역-결핍 환자를 대상으로 하는 경우, 적혈구는 방사선 조사(irradiation)를 거친다(RJ. Davey Immunol. Invest. 1995, 24 (1-2) : 143-149).
- [0059] 본 발명의 특별한 특징에 따르면, 현탁액을 제조하기 위해 이용되는 초기 혈구 농축액은 사전에 적혈구 이외의 혈액 요소들을 제거하도록 의도된 처리 절차를 거쳤다. 이와 같은 유형의 처리, 예를 들면, 혈장 또는 보존 용액을 제거하기 위해 염수로 세척하는 처리는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있다.
- [0060] 특정한 방법에 따르면, 세척은 캡슐화될 하나 이상의 활성 성분의 존재 하에 수행된다.
- [0061] 세척은 적혈구 세척용의 4중 파우치(quadruple pouch) 또는 4 파우치 기법과 같은 통상적인 기법에 의해 수행될 수 있다(MacoPharma 방법 및 이식(transfer) 파우치). COBE 2991 Cell Processor 형의 자동 적혈구 세척 장치를 이용하는 것도 가능하다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 적혈구는 삼투력을 증가시키고 및/또는 균질화시킬 수 있는 용액으로 사전에 처리될 수 있다. 그와 같은 용액은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들면, L-카르니틴을 포함하는 용액은 수득될 적혈구의 삼투력의 개선을 가능하게 한다. 다른 예들은 헤파린, 시트레이트-포스페이트-텍스트로오스(CPD) 및 만니톨의 용액을 포함할 수 있다.
- [0063] 용해 단계 동안의 온도는 바람직하게는 +2 내지 +6°C에서, 훨씬 더 바람직하게는 +4°C에서 유지된다.
- [0064] 재봉합 절차는 바람직하게는 용해된 현탁액(lysed suspension)의 재가열 및 고장성 재봉합 용액(hypertonic resealing solution)의 첨가에 의해 수행된다. 재봉합 온도는 +30 내지 +40°C일 수 있다. 이는 바람직하게는 +35 내지 +38°C, 예를 들면, 약 37°C일 있다. 반응(incubation)은 통상적으로 15분 내지 45분간 지속될 수 있다.
- [0065] 바람직하게는, 투석 카트리지를로부터 방출된 현탁액 및 고장성 재봉합 용액이 바람직하게는 지속적으로, 중간 파우치(intermediate pouch)로 도입된다. 그 내부에서 현탁액을 재가열하고 재봉합이 일어나기에 충분한 기간 동안 원하는 온도에서 방치한다. 특정한 양태에 따르면, 중간 파우치는 그 내부 온도가 선택된 온도로 제어되는 가열된 챔버 또는 모듈에 배치된다.
- [0066] 하나의 변형으로, 재봉합 용액뿐 아니라 현탁액을 중간 파우치에 넣을 수 있다. 전체 현탁액이 그 파우치로 수집되면, 밀봉하여 원하는 온도로의 가열 및 그 온도에서의 방치를 가능하게 하는 모듈로 이전된다.
- [0067] 재봉합된 적혈구의 현탁액은 그 후 결합되지 않거나 적합하게 결합되지 않은 세포들, 잔류물 및 세포의 헤모글로빈을 제거하기 위해 염수에 의한 하나 이상의 세척 단계에 적용될 수 있다.
- [0068] 또 다른 특징에 따르면, 적혈구는 적혈구 보존용 용액, 예를 들면, L-카르니틴을 포함하는 용액에서 처리된다.
- [0069] 생성된 적혈구는 바람직하게는 +1 내지 +8°C, 바람직하게는 +2 내지 +6°C, 통상적으로 약 +4°C에서 보관된다.
- [0070] 사용을 위해 준비된 생성물의 최종 적혈구 용적율은 실제로 40 내지 70%이다.
- [0071] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 적혈구를 제조하는 방법을 수행하기 위해 이용될 수 있는 용해/재봉합 장치에 관한 것이며, 상기 장치는:
  - [0072] - +1 내지 +8°C의 온도로 냉장될 수 있고 상기 온도를 냉각시키고 제어하는 수단을 포함하는 모듈,
  - [0073] - 상기 모듈 내에 배치될 수 있도록 구성되고 일면은 용해 용액의 유입구(inlet)에 연결될 수 있고, 나머지 일면은 적혈구 현탁액의 유입구에 연결될 수 있는 투석 카트리지를 포함하는 것인 멸균된, 일회용의 제거가능한 조립체,
  - [0074] - 처리 대상 적혈구의 삼투압 취약성에 따라, 상기 용해 카트리지를 통한 상기 적혈구 현탁액의 유속을 조절하

고 및/또는 상기 용해 용액의 오스몰 농도를 조절하는 수단;을 포함한다.

- [0075] 일 구체예에 따르면, 그 자체로 본 발명의 일 양태인 상기 제거가능한 조립체는 일회용 키트이고 적혈구 현탁액을 수용할 수 있는 파우치 및 상기 파우치를 투석 카트리지에 연결하는 튜브를 포함하고, 상기 모듈은 그 튜브와 동시-작동될 수 있고(co-operate) 상기 적혈구 현탁액을 상기 파우치로부터 상기 카트리지를 향해 또는 이를 통해 순환시킬 수 있는 펌프를 포함하고, 상기 펌프는 선택적으로 유속을 조절하는 수단에 연결된다. 그 조립체는 무균성(sterility)이 유지될 수 있게 한다.
- [0076] 유리한 특징에 따르면, 파우치에는 그의 양 말단에서 파우치에 연결된 루프형 튜브가 더 제공되고, 상기 모듈은 그 튜브와 동시-작동될 수 있고 파우치 내의 내용물의 파우치 내외부로의 순환을 일으킬 수 있는 펌프를 포함한다. 루프형 튜브가 제공되고, 하나 이상의 유입구 또는 유출구(outlet)을 갖춘, 그와 같은 유연성 있는 파우치는 그 자체로 본 발명의 일 양태를 구성한다. 그 파우치는 각 유입구/유출구에 연결되는 하나 이상의 다른 유연성 있는 튜브를 포함할 수 있다. 그 파우치는 루프형 튜브와 동시-작동되도록 배열된 펌프(예를 들면, 정량 펌프) 및/또는 파우치 및 선택적으로 펌프에 대한 지지물(support)과 결합될 수 있다. 그와 같은 파우치는 인간 또는 동물에 조성물(예를 들면, 현탁액, 유제)을 투여하기 위해 이용될 수 있고, 이는 조성물 예를 들면, 비경구(parental) 투여용 조성물에서 주어진 정도의 균질도를 보존하는 것이 바람직하기 때문이다.
- [0077] 또 다른 유리한 특징에 따르면, 온도 프로브가 루프형 튜브 상에 배열된다.
- [0078] 또 다른 특징에 따르면, 활성 성분을 주사하기 위한 튜브는 파우치를 투석 카트리지의 《혈액》 유입구에 연결하는 튜브에 연결된다.
- [0079] 또 다른 특징에 따르면, 투석 카트리는 용해 용액을 수용할 수 있는 플라스크에 튜브에 의해 연결되고, 냉각 모듈은 상기 플라스크에 대한 수용 수단(receiving means) 및 용해 용액이 투석 카트리를 향해 및 투석 카트리를 통해 순환될 수 있도록 상기 튜브와 동시-작동될 수 있는 펌프를 포함한다.
- [0080] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 냉각 수단 및 온도 제어 수단은 모듈 내에서 +2 내지 +8℃의 온도, 바람직하게는 +4℃ 수준의 온도를 유지할 수 있다.
- [0081] 또 다른 특징에 따르면, 투석 카트리의 《혈액》 유출구는 상기 모듈의 외부로 개방되거나 또는 개방될 수 있는 유출구 튜브에 연결된다. 또 다른 특징에 따르면, 활성 성분을 주사하기 위한 튜브는 그 유출구 튜브에 연결된다. 유출구 튜브는 용해로부터 방출된 적혈구 현탁액 및 재봉합 용액(바람직하게는, 중간 파우치에 개방된 지점보다 약간 상류에 있는 유출구 튜브로 개방된 이차 튜브를 통해 도입됨)을 수집할 수 있는 이차 파우치(중간 파우치)에 연결될 수 있다. 그 파우치는 유리하게는 모듈 내의 온도를 +30 내지 +40℃, 바람직하게는 +35℃ 내지 +38℃로 제어할 수 있는 수단이 제공된 이차 모듈 내에 배열된다.
- [0082] 유리한 구체예에 따르면, 일회용의 제거가능한 조립체는 단일 유닛으로, 파우치, 순환 튜브, 주입 튜브(주입 장치 또는 그와 같은 장치와 동시-작동되도록 의도된 용기(receptacle)을 갖춘), 투석 카트리지 및 바람직하게는 용해 용액용 플라스크를 포함한다.
- [0083] 바람직하게는, 제거가능한 조립체 자체는 냉각 또는 가열을 위해 의도된 특정 수단을 포함하지 않는다. 이 기능들은 조립체의 두 부분(portion)이 배치되는 모듈 또는 챔버에 의해 수행될 뿐이다.
- [0084] 본 발명의 방법 및 장치에서 이용되는 펌프는 바람직하게는 정량 펌프(폐색(occlusion) 펌프)이고; 일 구체예에 따르면, 일차 파우치(initial pouch)의 내외부로의 현탁액의 재순환을 일으키는 펌프 및 용해용 완충액을 순환시키는 펌프는 일정한, 사전에 결정된 회전 속도(rotation rate)를 가지는 반면, 현탁액을 투석 카트리를 향해 전달하는 펌프는 처리 대상인 적혈구의 삼투압 취약성에 따라 조절될 수 있는 회전 속도를 갖는다.
- [0085] 활성 성분은 임의의 적합한 수단, 예를 들면, 선택적으로 제어되고 상응하는 주입 튜브에 연결되는 정속 플런저 주사기(fixed-rate plunger syringe)에 의해 도입될 수 있다. 일 변형으로서, 플런저 주사기는 정량 펌프로 대체될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 장치는 처리 대상 적혈구의 삼투압 취약성에 따라 용해 카트리를 통한 적혈구 현탁액의 유속을 조절하고 및/또는 용해 용액의 오스몰 농도를 조절하는 수단을 포함한다.
- [0087] 일 특징에 따르면, 유속 조절 수단은 현탁액을 투석 카트리를 향해 전달하는 펌프를 제어하도록 구성된다. 또 다른 대안적인 특징에 따르면, 조절 수단은 오스몰 농도를 희석하고 낮추거나 도입되는 적합한 용질에 의해 그 오스몰 농도를 증가시키기 위해 용해 용액의 오스몰 농도를 제어하도록 구성된다. 일 변형으로, 처리대상인 적

혈구의 삼투압 취약성에 따라 조절된 오스몰 농도를 갖는 용해 용액이 선택적으로 모듈로 도입될 수 있다.

- [0088] 바람직한 방법에 따르면, 본 발명의 장치는 작동자(operator)가 입력한 명령(예를 들면, 작동자가 직접 적혈구 현탁액의 유속에 관한 데이터를 입력함)에 따라, 또는 작동자가 삼투압 취약성과 관련하여 입력한 데이터에 따라(상기 전자 수단은 용해 파라미터, 예를 들면, 적혈구 현탁액의 유속을 정하고 조절하도록 구성됨) 용해 과정 및 선택적으로 재봉합 과정을 제어할 수 있는 전자 수단을 포함한다. 그와 같은 전자 수단은 바람직하게는 온도 센서에 연결된다(모듈 내 및/또는 적혈구 현탁액에 대한 온도 센서에서의 온도가 제어될 수 있음). 그 수단은 펌프, 예를 들면, 투석 카트리지를 통한 현탁액의 압력 및 유속을 제어하고 작동할 수 있다.
- [0089] 모듈에는 바람직하게는 적어도 일면에는 장치(installation) 및 용액 및/또는 현탁액의 순환의 육안 제어를 가능하게 하는 유리 표면이 제공된다.
- [0090] 본 발명에 따른 방법 및 장치는 특히, 인간 또는 동물의 치료법에서 이용되는 약제, 백신, 효소, 펩티드, 항원 및 조영제로부터 선택된, 다수의 활성 성분들을 내재화하기 위해 이용될 수 있다(예를 들면, C. G. Millan, J. Controlled Released 2004, 95: 27-49 참조).
- [0091] 본 발명은 또한 아스파라기나아제의 효과적이고, 재현가능하며, 확실하고, 안정한 내재화에 대한 본 발명에 따른 방법의 적용에 관한 것이다. 아스파라기나아제(asparaginase)라는 용어는 본 발명에 따라, 천연, 합성, 인공 또는 재조합인지 여부에 관계없이 임의의 기원의 아스파라기나아제 및 이를 내포하는 유도체, 예를 들면, 아스파라기나아제와 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 폴리머의 조합(예를 들면, PEG에 캡슐화된 아스파라기나아제의 일종인 페길화-아스파라기나아제(pegulated-asparaginase) 또는 펙아스파라기나아제(pegasparaginase); 예를 들면, Enzon and Medac에 의해 판매되는 Oncaspar<sup>®</sup>)을 의미하도록 의도된다.
- [0092] 다양한 가능한 방법에 따르면, 아스파라기나아제는 일차 파우치(initial pouch) 및/또는 투석 카트리지의 상류 및/또는 하류에 있는 현탁액의 순환에 도입된다. 바람직하게는, 아스파라기나아제는 투석 카트리지의 상류의 현탁액의 순환으로 도입된다. 유리하게는, 삼투압 취약성은 아스파라기나아제를 포함하는 현탁액을 대상으로 측정된다. 그 후, 현탁액은 재봉합되고, 세척되며, 선택적으로 그에 보존 용액이 첨가되며, 그 후, 바람직하게는 유연성 있는 파우치에 보관되어 사용을 위한 상태로 준비된다.
- [0093] 아스파라기나아제가 현탁액에 정량(meter)될 수 있게 하는 방법들이 공지되어있고, 따라서, 최종 파우치 내의 현탁액 용량을 치료를 위해 처방된 용량에 일치하도록 조절할 수 있다.
- [0094] 바람직한 구체예에 따르면, 초기 농축액으로부터 백혈구가 제거되고 및/또는 초기 농축액은 방사선으로 조사된다.
- [0095] 특정한 양태에 따르면, 조합된 치료제를 위해 의도된 활성 성분, 예를 들면, 빈크리스틴 및/또는 메토티렉세이트, 및/또는 선택적으로 유용한 기타 활성 성분이 아스파라기나아제 외에 또한 도입된다.
- [0096] 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 수행하여 수득될 수 있고 아스파라기나아제를 포함하는 적혈구의 현탁액 또는 농축액에 관한 것이다. 이 현탁액은 약학적으로 허용가능한 염수로 제조될 수 있다(일반적으로, 적혈구용 표준 배지, NaCl 및 글루코오스, 텍스트로오스, 아데닌 및 만니톨로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함하는 용액; 예를 들면, SAG-만니톨 또는 ADsol). 이 용액은 적혈구의 보존을 보장할 수 있고 L-카르니틴과 같은, 보존 첨가제를 포함할 수 있다. 적혈구는 또한 빈크리스틴 및/또는 메토티렉세이트, 및/또는 선택적으로 아스파라기나아제와 조합되어 유용한 기타 활성 성분을 포함할 수 있다. 현탁액 또는 농축액은 사용 전에 희석되기 위해 처리될 수 있다. 현탁액은 또한 사용을 위해 준비되도록 처리될 수 있다. 사용될 상태에 있는 산물의 최종 적혈구 용적율 수준은 바람직하게는 40 내지 70%이다.
- [0097] 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 수득될 수 있는 아스파라기나아제를 포함하는 적혈구 현탁액의 유효량을 투여하여 급성 림프모구성 백혈병 및 림프종을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특별한 양태는 환자 또는 한 명 이상의 공여자로부터 하나 이상의 혈액 시료를 채취하는 단계, 적혈구의 농축액을 제조하는 단계, 본 발명의 방법에 따라 아스파라기나아제를 내재화하는 단계 및 아스파라기나아제를 내포하는 적혈구 배치(batch)를 제조하는 단계, 및 환자에게 정맥내 경로를 통해 현탁액을 투여하는 단계를 포함한다. 통상적으로, 처리된 적혈구 현탁액은 체중 kg당 60 내지 200 유닛의 아스파라기나아제에 해당하는 용량(volume)으로 투여된다.
- [0098] 본 발명은 또한 환자의 급성 림프모구성 백혈병 및 림프종을 치료하기 위해 의도된 약제 또는 약물의 제조를 위해 본 발명의 방법에 따라 수득되고 아스파라기나아제를 포함하는 적혈구의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 특정한 양태는 적혈구의 농축액을 준비하기 위해 환자 또는 한 명 이상의 공여자로부터 채취된 하나 이상의 유닛



의 혈액의 이용, 본 발명에 따른 아스파라기나아제의 내재화 및 환자를 치료하기 위해 아스파라기나아제를 내포하는 적혈구의 배치를 생성하는 단계를 포함한다. 특정한 방법에 따르면, 이 용도는 투여량, 예를 들면, 단위 체중 kg당 60 내지 200 유닛의 아스파라기나아제에 해당하는 양을 포함하는 처리된 적혈구 현탁액의 용량을 포함하는 파우치를 제조하기 위해 의도된다.

- [0099] 본 발명은 또한 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트 및 이노시톨 펜타포스페이트 또는 그의 유도체의 효과적이고, 재현가능하며, 확실하고 안정한 내재화에 대한 본 발명에 따른 방법의 적용에 관한 것이다. 이노시톨 헥사포스페이트가 바람직하다.
- [0100] 가능한 다양한 방법에 따르면, 이노시톨 포스페이트는 일차 파우치 및/또는 투석 카트리지의 상류 및/또는 하류 현탁액의 순환으로 도입된다. 바람직하게는 일차 파우치로 도입된다. 이노시톨 포스페이트를 포함하는 현탁액에 대해 삼투압 취약성을 측정하는 것이 유용하다. 그 후, 현탁액을 용해하고, 재봉합시키고, 세척하고, 선택적으로 보존 용액을 첨가하며, 그 후, 사용을 위해 준비된 상태로 바람직하게는 유연성 있는 파우치에 보관한다.
- [0101] 이노시톨 포스페이트가 현탁액에 정량될 수 있게 하는 방법들이 공지되어있고, 따라서, 최종 파우치 내의 현탁액 용량을 치료를 위해 처방된 용량에 일치하도록 조절할 수 있다.
- [0102] 바람직한 구체예에 따르면, 초기 농축액으로부터 백혈구가 제거되고 및/또는 초기 농축액은 방사선으로 조사된다.
- [0103] 본 발명은 또한 본 발명의 방법을 수행하여 수득될 수 있는, 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트 또는 펜타포스페이트를 포함하는 적혈구의 현탁액 또는 농축액에 관한 것이다. 이 현탁액은 약학적으로 허용가능한 염수로 제조될 수 있다(일반적으로, 적혈구용 표준 배지, NaCl 및 글루코오스, 텍스트로오스, 아테닌 및 만니톨로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함하는 용액; 예를 들면, SAG-만니톨 또는 ADsol). 이 용액은 적혈구의 보존을 보장할 수 있고 L-카르니틴과 같은, 보존 첨가제를 포함할 수 있다. 현탁액 또는 농축액은 사용 전에 회석되기 위해 처리될 수 있다. 현탁액은 또한 사용을 위해 준비되도록 처리될 수 있다. 사용될 상태에 있는 생성물의 최종 적혈구 용적을 수준은 바람직하게는 40 내지 70%이다.
- [0104] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 수득될 수 있는, 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트를 내포하는 적혈구 현탁액의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양 산소화(tumoral oxygenation), 특히, 방사선 요법과 관련된 종양 산소화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특정 양태는 환자 또는 한명 이상의 공여자로부터 하나 이상의 혈액 시료를 채취하는 단계, 적혈구의 농축액을 제조하는 단계, 본 발명의 방법에 따라 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트를 내재화하는 단계, 및 상기 화합물을 내포하는 적혈구의 배치를 생성하는 단계, 및 상기 현탁액을 정맥 내 경로를 통해 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 이 방법은 방사선요법 치료와 관련되고 따라서 방사선 요법 치료 내내 또는 그의 일부 동안 지속적으로 정맥 내 경로를 통해 처리된 적혈구를 투여하는 것이 가능하고, 바람직하게는 또한 방사선 요법의 치료 전 및/또는 후, 충분한 기간 동안 투여하는 것이 가능하다.
- [0105] 본 발명에 따른 방법은 다양한 암 및 특히 폐, 전립선, 직장, 식도의 암 및 뇌종양의 치료에 이용될 수 있다. 본 방법은 특히 미약하게 방사선-민감성이고(radio-sensitive), 전반적으로 저산소 상태(hypoxic)인 종양, 특히 악성 신경교종(malignant glioma)을 위해 의도된다. 본 발명의 특정 양태에 따르면, 본 방법은 교아종(glioblastoma) 및 이비인(ENT:ear-nose-throat) 암의 치료를 위해 의도된다.
- [0106] 본 발명은 또한 전술된 종류의 종양을 특히, 방사선요법과 연계하여 치료하기 위한 약제 또는 약물의 제조를 위한 본 발명의 방법에 따라 수득될 수 있는, 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트를 포함하는 적혈구의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 특정한 양태는 적혈구의 농축액을 준비하기 위해 환자 또는 한명 이상의 공여자로부터 채취된 하나 이상의 유닛의 혈액의 이용, 본 발명에 따른 활성 화합물의 내재화 및 그 화합물을 내포하는 적혈구의 배치를 생성하여 그 적혈구로 환자를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0107] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 수득될 수 있는, 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트를 내포하는 적혈구의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 겸상혈구증(drepanocytosis) 또는 기타 저산소 상태를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특정한 양태는 적혈구의 농축액을 준비하기 위해 환자 또는 한명 이상의 공여자로부터 채취된 하나 이상의 유닛의 혈액의 이용, 본 발명에 따른 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트의 내재화 및 그 화합물을 내포하는 적혈구의 배치를 생성하여 그 적혈구로 환자를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0108] 본 발명은 또한 저산소증(hypoxia)을 가진 환자를 치료하기 위해 의도된 약제 또는 약물의 제조를 위한, 본 발

명의 방법에 따라 수득될 수 있는 이노시톨 포스페이트, 특히, 이노시톨 헥사포스페이트를 포함하는 적혈구의 용도에 관한 것이다. 저산소증은 조직, 특히, 근육 및 뼈에 대한 낮은 산소 전달을 특징으로 한다. 이 치료는 특히, 겸상혈구증을 앓는 환자를 치료하는 것이 특히 흥미롭다. 본 발명의 특정한 양태는 적혈구의 농축액을 준비하기 위해 환자 또는 한 명 이상의 공여자로부터 채취된 하나 이상의 유닛의 혈액의 이용, 본 발명에 따른 활성 화합물의 내재화 및 그 화합물을 내포하는 적혈구의 배치를 생성하여 그 적혈구로 환자를 치료하는 단계를 포함한다.

[0109] 적혈구에 내포된 이노시톨 헥사포스페이트 또는 그 등가물은 헤모글로빈의 산소 친화도를 감소시킨다. 이는 조직의 보다 양호한 산소화 및 겸상혈구증에 따른저산소 증상의 감소를 가져온다. P50은 헤모글로빈의 50% 산소 포화에 해당하는  $O_2$  분압( $PO_2$ )이다. P50의 25 mmHg 증가는 약 두 배의 산소화 증가를 가져온다(산소화는 100 mmHg의  $PO_2$  값과 40 mmHg의  $PO_2$  값의 포화도 간의 차이임). 따라서, 2000 ml의 적혈구를 갖는 성인의 경우, 이노시톨 헥사포스페이트를 포함하는 200ml의 적혈구를 포함하는 혈액 백의 수혈은 적혈구의 10% 이상의 증가를 가져와, 두 배의 산소화 파워를 갖게 할 수 있다. 이는 저산소증 환자들에게 유용한 산소화의 20%를 초과하는 정도의 증가를 가져온다.

[0110] 본 발명은 개인의 적혈구 량(erythrocyte mass)의 5 내지 20%, 바람직하게는 10-15%에 해당하는 용량의 수혈을 포함하고, 수혈 빈도는 유리하게 1개월 또는 2개월에 1회일 수 있다.

### 실시예

[0118] 실시예 1 : 장치(INSTALLATION)

[0119] 먼저 도 1을 참조한다. 점선 내에 있는 제1프레임은 전반적으로 평행 6면체형이고, 도시되어 있지는 않으나 개폐가 가능하도록 형성된 유리로 된 전면(front face)을 포함하는 제1모듈(1)을 나타낸다. 하기에 기술될 제거 가능한 조립체(removable assembly)의 정량 펌프(P1, P2 및 P3) 및 수용 수단(receiving means)(도시되지 않음)이 상기 모듈의 하부에 배열된다. 펌프(P1 및 P3)은 일정한, 사전에 정해진 유속을 갖는다. 펌프(P2)는 유속이 변하도록 제어된다.

[0120] 상기 제거가능한 조립체는 용해될 적혈구 현탁액을 포함하는 유연성 있는 파우치(2)를 포함한다. 상기 파우치(2)에는 적혈구가 현탁액 상태로 유지될 수 있도록 파우치의 내외부로 순환을 일으키기 위해 펌프(P1)와 동시-작동되는, 루프형 구조의 유연성 있는 튜브(3)가 제공된다. 상기 파우치는 또한 그 기부에서 투석 카트리지(5)의 <<혈액>> 구획의 유입구에 연결된 유연성 있는 튜브(4)에 연결된다. 상기 튜브(4)는 상기 현탁액의 파우치로부터 카트리지로의 순환을 일으키는 펌프(P2)와 동시-작동된다. 제어 플러저 형 주사기(PS1)은 카트리지(5)의 상류에 있는 튜브(4)에 연결되고, 상기 플러저 형 주사기는 활성 성분을 적혈구의 순환에 도입하도록 의도된다. 카트리지(5)의 <<혈액>> 구획의 유출구는 모듈(1)의 외부로 개방되는 유연성 있는 유출구 튜브(6)에 연결된다. 제2의 제어 플러저 형 주사기(PS2)는 튜브(6)에 연결되고, 상기 플러저 형 주사기는 활성 성분을 용해된 적혈구의 순환에 도입하도록 의도된다. 용해 용액을 담은 플라스크(7)가 모듈(1)에 배열되고 용해 용액의 카트리지(5)를 통한 순환을 일으키는 펌프(P3)과 동시-작동하는 유연성 있는 튜브(8)에 의해 카트리지(5)의 <<투석액>> 유입구에 연결된다. 최종적으로, 카트리지로부터 방출된 용해 용액은 모듈(1)의 외부에 위치한 플라스크(10)로 개방되는 유연성 있는 배출(evacuation) 튜브(9)에 의해 모듈(1)로부터 배출된다.

[0121] 유출구 튜브(6)은 전반적으로 평행 6면체형이고 도시되어 있지는 않으나 개폐가 가능하도록 형성된 유리로 된 전면을 포함하는 제2 모듈(11)을 나타낸다. 제거가능한 조립체의 부분을 형성하는 수용 요소를 위한 수단(도시되지 않음)이 상기 모듈의 하부 상에 배열된다. 이들은 튜브(6)에 연결되고 용해된 현탁액이 보관되어 있는 유연성 있는 파우치(12)를 포함한다. 제어 플러저 형 주사기(PS3)은 상기 튜브(6)에 연결되고 재봉합된 산물이 주사될 수 있게 한다.

[0122] 제거가능한 조립체는 전적으로 과정의 완전한 가시화를 가능하게 하는 유연하고 투명한 플라스틱 소재로 제조된다.

[0123] 본 장치에는 또한 도시되지 않은 다양한 수단이 제공된다:

[0124] - 특히, 그 내부에서 순환되는 현탁액의 온도를 측정하기 위해 튜브(3) 상에 배치된 온도 프로브, 상기 모듈(1)의 내부 온도(T1)을 측정하기 위한 온도 프로브를 포함하는 것인 모듈(1)의 내부가 냉각되고 그 온도가 +2 내지 +4℃로 조절되게 하는 수단,

[0125] - 모듈(11)에 더 제공된, 상기 모듈(11)의 내부를 가열하고 그 내부의 온도(T2)가 +37 내지 +38℃로 조절되게



하고; 온도 프로브가 그 모듈 내부에 존재하는 것인 수단,

- [0126] - D1 및 D2에 있는 튜브에서 적혈구 존재 여부를 검출하는 수단(예를 들면, 초음파 수단 또는 색차측정(colorimetric) 수단),
- [0127] - 투석 카트리지의 유입구에서 압력을 측정하는 수단(PR1),
- [0128] - 일차로, 온도 프로브, 압력 프로브 및 검출 수단으로부터 정보를 수용하고이차로 용해 파라미터의 조절과 관련된 정보를 수용하며; 그 데이터에 근거하여, 펌프(P1, P2 및 P3)를 제어하는 전자 장치. 방법 흐름도가 도 2에 도시된다.
- [0129] 전자 장치는 전송된 흐름도를 실행하도록 설계된 컴퓨터로 구성된다.
- [0130] 추가적인 특징에 따르면, 전자 장치는 각 용해 절차의 파라미터 및 따라서 처리된 각 농축액의 파라미터를 기록한다.

[0131] 실시예 2: 아스파라기나아제의 캡슐화

[0132] 본 실시예에서, 삼투압 취약성은 약 50%의 용혈을 일으키는 g/L로 표현된 NaCl 농도로 정의된다.

[0133] 1) 삼투압 취약성에 대한 아스파라기나아제의 영향:

[0134] a. 아스파라기나아제 용액의 제조:

[0135] 2.5 ml의 0.9% NaCl을 분말 제형의 아스파라기나아제 10000 IU을 포함하는 플라스크로 격막을 통해 주사기로 주입하였다. 상기 혼합물을 용해될 때까지 흔들어서, 4000 IU/ml 농도의 모 용액(mother solution)을 수득하였다. 내용물을 주사기에 의해 제거하여 5 ml 용혈 튜브에 넣었다. 3개의 용액을 제조하여 +4℃에서 보관하였다: 0 IU/ml 용액(0.9% NaCl 대조구), 3200 IU/ml 용액(625 μl의 0.9% NaCl 용액을 상기 모 용액에 첨가함) 및 1600 IU/ml 용액(1 ml의 3200 IU/ml 용액을 취하고, 여기에 1 ml의 0.9% NaCl을 첨가했음).

[0136] b. 적혈구의 세척:

- [0137] - 시트레이트 포스페이트 텍스트로오스 상으로 채취된 전혈(whole blood)을 1000g로 +4℃에서 20분간 원심분리하고,
- [0138] - 혈장을 경사분리시키고 연막(buffycoat)를 제거하며,
- [0139] - +4℃에서 0.9% NaCl을 1 대 1 용량(volume for volume)으로 적혈구 농축액에 첨가하고,
- [0140] - 1000g로 20분간 원심분리 한 후, 상층액을 제거하고,
- [0141] - 선행하는 두 단계들을 반복하여 제2 세척 작업 및 제3 세척 작업을 수행하고,
- [0142] - 상층액을 제거하고 0.9% NaCl 용액으로 적혈구 용적율을 80%로 조절하고,
- [0143] - 875 μl의 적혈구 현탁액을 담은 튜브를 준비하였다.
- [0144] 이 세척은 6명의 상이한 공여자로부터 얻은 6개의 혈액 시료에 대해 수행하였다.

[0145] c. 아스파라기나아제 용액의 첨가

- [0146] - 상기 6개의 시료에 대해 초기 삼투압 취약성을 측정하였다.
- [0147] - 각 아스파라기나아제 농도당 6개의 튜브에 125 μl의 0, 1600 또는 3200 IU/ml 아스파라기나아제 용액을 첨가하고; 각 튜브를 수분 간 가볍게 흔들어주었다. 각각 6개의 튜브로 구성된 세 군에 포함된 최종 농도는 0, 200 및 400 IU/ml였다. 삼투압 취약성을 측정할 때까지 튜브들을 잘게 부순 얼음 상에서 +4℃로 보관하였다.
- [0148] - 4개의 방치 시간을 테스트하였다: 5, 15, 30 및 60분. 방치 시간의 종료는 부순 얼음으로부터 튜브를 꺼내는 것으로 정했다.

- [0149] - 삼투압 취약성의 측정은 실온에서 수행하였다.
- [0150] d. 삼투압 취약성의 측정은 OSMOCELLS<sup>®</sup> 라는 명칭으로 SODEREL MEDICAL, Haillecourt, France에 의해 판매되고 있는 장치상에서 수행하였다.
- [0151] e. 결과
- [0152] 아스파라기나아제의 부재 또는 존재 하에, 투석 전 적혈구의 삼투압 취약성의 발생 및 분산(dispersion)을 도 3, 도 4 및 도 5에 도시하였다.
- [0153] 이 결과들은 존재하는 아스파라기나아제의 농도 및 시간에 따라 혈액 시료 간 적혈구의 삼투압 취약성의 광범위한 변이를 보여준다. 이 결과들은 처리 대상인 적혈구 시료의 삼투압 취약성을 투석 단계에 가능한 한 근접한 시점에, 바람직하게는 캡슐화될 아스파라기나아제의 존재 하에 측정하는 것의 중요성을 강조한다.
- [0154] 2) 캡슐화 및 재봉합(rescaling) 방법:
- [0155] a. 장비
- [0156] - 투석 카트리지:
  - [0157] · GAMBRO, Lakewood, CO, USA에 의해 판매되는 PRISMA M60 PPI 모델
  - [0158] · 치수(cm) : 38 x 21 x 9
  - [0159] · 혈액 챔버 용량: 84 ml
  - [0160] · 공동 섬유: 아크릴로니트릴 및 소듐 메탈릴 술포네이트 공중합체
  - [0161] · 유효 표면적: 0.60 m<sup>2</sup>
- [0162] - 장치의 작동 파라미터:
  - [0163] - P1 = 20 ml/분
  - [0164] - P2 = 가변적
  - [0165] - P3 = 150 ml/분
  - [0166] - PS3 = P2의 10%
  - [0167] - T2 = 30 분
- [0168] b. 생성물
- [0169] - "Centre de Transfusion Sanguine"(프랑스 수혈 센터)에 의해 제공된 팩에 든 적혈구, 즉, SAG-만니톨에 현탁된 적혈구,
- [0170] - 적혈구 용적율 70%로의 조절
- [0171] - 아스파라기나아제 용액: 투석 전에 적혈구 현탁액 ml 당 400 IU를 포함함.
- [0172] c. 결과
- [0173] 도 6은 투석기에서 22 ml/분의 유속(P2)에 의한 400 IU/ml 아스파라기나아제의 캡슐화 수율을 도시한다. 캡슐화 수율은 투석 전 삼투압 취약성에 따라 변하는 것으로 보인다(5 개의 시료). 측정된 삼투압 취약성에 따라 투석 파라미터들, 특히, 투석기에서 적혈구 현탁액의 유속을 조절하여 혈액 시료에 내재된 변이성에도 불구하고 가능

한 한 일정한 캡슐화 수율을 얻을 수 있도록 본 발명의 방법을 최적화하였다.

[0174] 유속(P2)(투석 카트리지 내의 적혈구 현탁액의 유속)을 조절 수단으로 취하여, 이용된 투석 카트리지에 대한 하기의 최적 수준을 정할 수 있었다.

[0175] 표 1:

삼투압 취약성 g/L	유속 P2 ml/min
> 4.7	24
4 to 4.7	25
3.5 to 4	22
< 3.5	20

[0176]

[0177] 4.7을 초과하는 삼투압 취약성에 대한 유속(P2)의 감소는 투석에 의한 현상으로 설명된다. 26 ml/분 이상의 수준인 유속에 대한 막 내외부간 압력의 증가는 삼투 효과의 증가를 가져온다. 따라서, 표시된 바와 같이, 유속(P2)를 감소시키는 것이 유리하다.

[0178] 본 발명의 방법에 따라 처리된 7개의 상이한 적혈구 시료의 혈액학적 파라미터 및 내재화 파라미터(P2는 표 1에 따라, 즉, 각 시료의 삼투압 취약성에 따라 조절됨)를 또한 추적하고, 그 혈액학적 파라미터를 건강한 개인에 대해 수득된 값들에 비교하였다. 측정된 혈액학적 파라미터의 평균이 표 2에 표시된다.

[0179] 표 2:

혈액학적 파라미터	초기 세포 물질	최종 생성물(JO)	+4℃, 24시간 후 최종 생성물	Norm values (순환 세포)
평균 세포 용적(MCV) (펄토 리터)	84.7 ± 2.9	76.6 ± 3.9	80 ± 3.7	83 - 97
평균 세포 헤모글로빈 (pg)	28.4 ± 1.7	22.1 ± 0.7	22.5 ± 1.6	28 - 32
평균 세포 헤모글로빈 농도(%)	34.0 ± 1.2	29.2 ± 0.9	27.9 ± 1.2	31 - 35
삼투압 취약성 (약 50% 용혈을 유도하는 영도) (g/l)	3.97 ± 0.5	3.53 ± 0.4	Not carried out	3.7 - 4.3
현탁액의 적혈구 용적율(%)	60.5 ± 3	50.4 ± 2.6	47.6 ± 3	NA
현탁액의 헤모글로빈 농도(g/dl)	18.7 ± 1.1	12.9 ± 0.7	13.1 ± 0.6	NA
적혈구 농도 (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	6.31 ± 0.44	5.8 ± 0.44	5.8 ± 0.37	NA
세포외 헤모글로빈(g/dL)	0	0	1	NA

[0180] NA=적용되지 않음

[0181] 내재화 파라미터:

[0182] J. L. Orsonneau, Annales de Biologie Clinique 2004, vol. 62, No. 5에 개시된 방법을 이용하여, 동결-해동을 통한 용해 후 적혈구에 대해 아스파라기나아제의 투여하였다.

[0183] - 10<sup>9</sup> 개의 적혈구 당 아스파라기나아제의 IU로 표현된 아스파라기나아제의 평균 혈구 수준(Mean globular level): 10 ± 1.1.

[0184] - 적혈구의 ml 당 IU로 표현된 아스파라기나아제의 평균 적혈구 농도(Mean corpuscular concentration): 112

± 11.3.

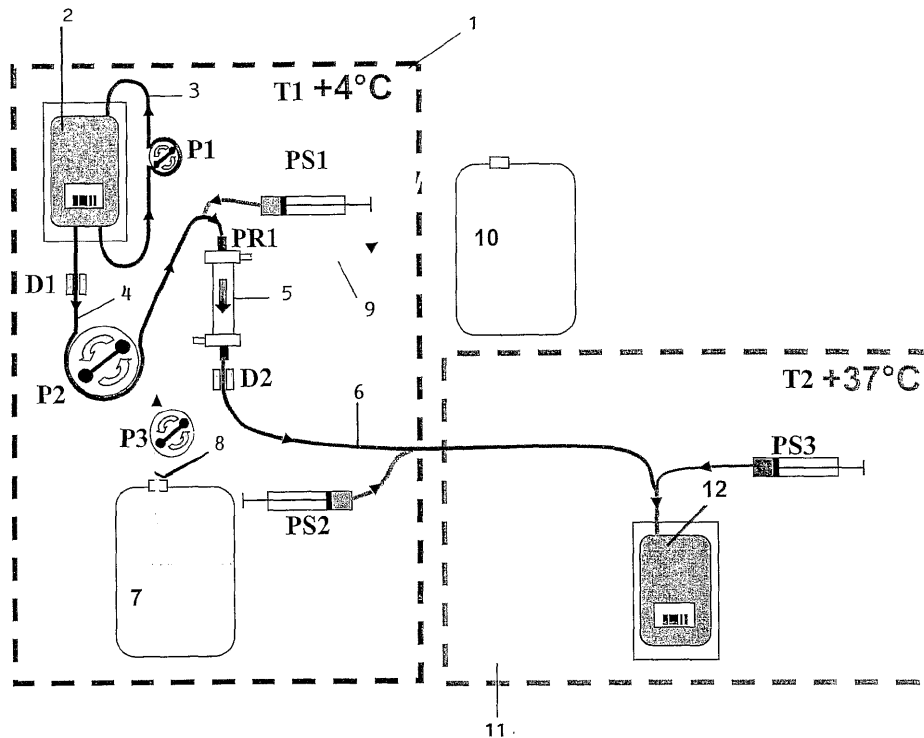
- [0185] - 캡슐화 수율(최종 생성물에서 아스파라기나아제의 적혈구 농도/투석 전 아스파라기나아제의 농도): 29.8% ± 2.1.
- [0186] 삼투압 취약성을 고려하지 않고 유속을 조절하지 않으며, 18 내지 30 ml/분의 유속(P2)으로 14개의 상이한 시료에 대해 수행된 예비 테스트에서, 32±12.4%의 평균 캡슐화 수율을 측정할 수 있었고, 이는 과도하게 큰 변이성을 의미한다. 반면에, 전술된 실험에서 유속(P2)의 조절은 훨씬 더 균질한 평균 캡슐화 수율을 얻을 수 있게 했다(29.8 % ± 2.1).

**도면의 간단한 설명**

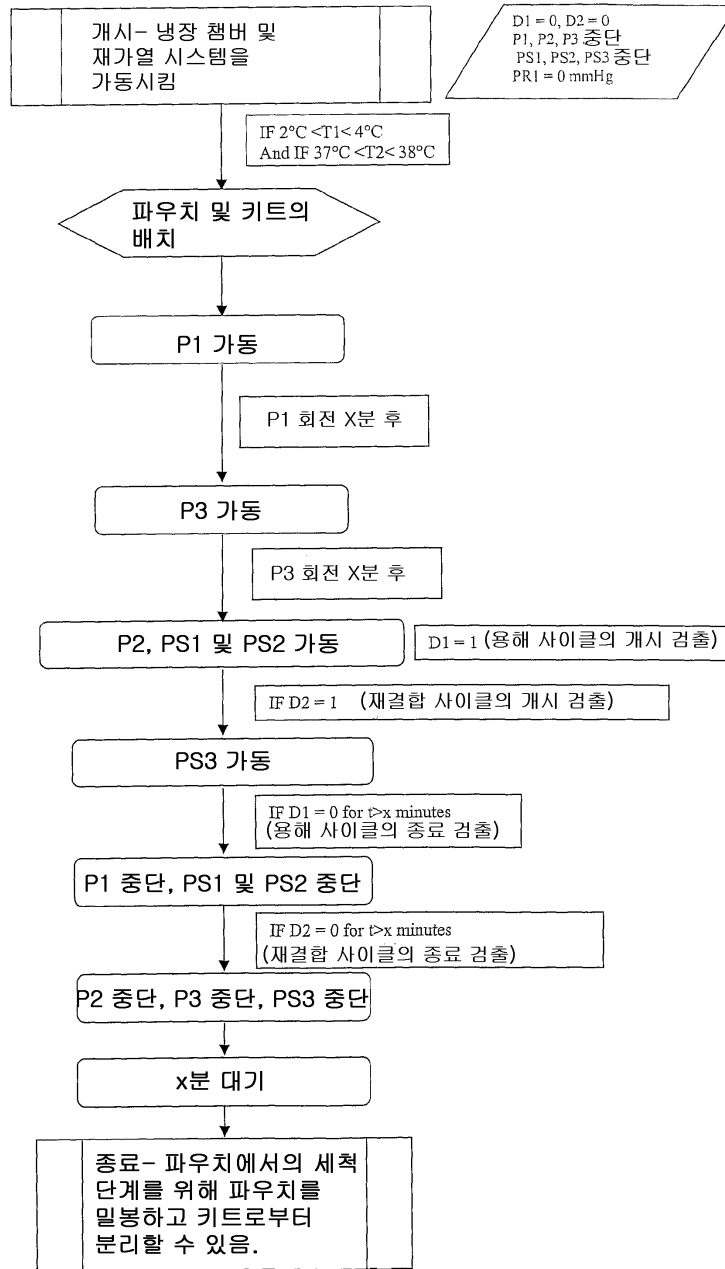
- [0111] 이하에서 본 발명은 구체에 및 도면을 참조하여 비-한정적인 실시예에 의해 보다 상세하게 기술될 것이다:
- [0112] - 도 1은 본 발명에 따른 용해/재봉합 장치의 개략적인 도면(schematic representation)이다;
- [0113] - 도 2는 본 발명의 방법의 기본적인 흐름도이다;
- [0114] - 도 3은 분으로 표현된 방치 시간에 따른 약 50% 용혈을 일으키는 NaCl의 농도(g/L)로 표현된, 적혈구의 용혈의 진행을 도시하는 그래프이다;
- [0115] - 도 4는 도 3에 유사한 그래프로서, 용혈이 아스파라기나아제(200 IU/ml)의 존재 하에서 측정된 경우이다;
- [0116] - 도 5는 도 3 및 도 4의 그래프에 유사한 그래프로서, 측정은 아스파라기나아제(400 IU/ml)의 존재 하에 수행되었다; 및
- [0117] - 도 6은 약 50% 용혈을 일으키는 NaCl의 농도(g/L)에 따른 캡슐화 수율을 도시하는 그래프이다.

**도면**

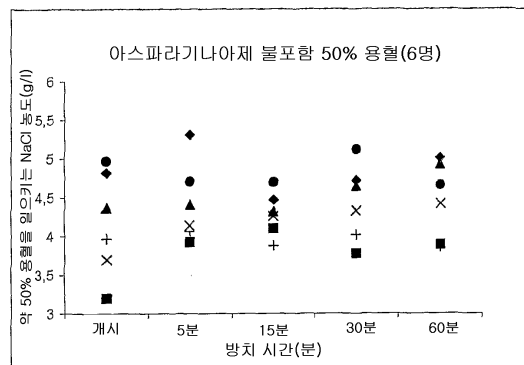
**도면1**



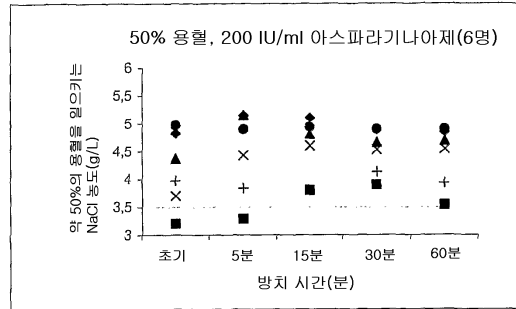
도면2



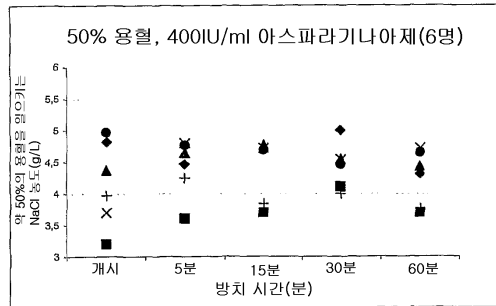
도면3



도면4



도면5



도면6

