



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0102319
 (43) 공개일자 2017년09월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61M 1/02 (2006.01) *A61K 35/19* (2014.01)
A61M 1/36 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61M 1/0272 (2013.01)
A61K 35/19 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-7021400
 (22) 출원일자(국제) 2015년12월30일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2017년07월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2015/068044
 (87) 국제공개번호 WO 2016/109655
 국제공개일자 2016년07월07일
 (30) 우선권주장
 62/098,795 2014년12월31일 미국(US)

(71) 출원인
안트로제네시스 코퍼레이션
 미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
 (72) 발명자
코르시디, 마누셰르
 미국 뉴욕 11020 그레이트넥 11 코넬 드라이브
 (74) 대리인
특허법인필앤은지

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **혈소판을 분리하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 혈소판을 분리하는 방법, 예를 들어 제대혈(umbilical cord blood)로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 혈소판-풍부 혈장을 제조하는 방법이 개시된다. 일 측면에서, 본 발명은 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 본 발명은 제대혈, 예를 들어, 인간 제대혈로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 상기 분리된 혈소판은 다양하게 응용되어 사용될 수 있으며, 예를 들어 자가 또는 동종 이계의 환경들에 있어서 상처 치료, 장기 수복 및/또는 재생, 및/또는 조직 수복 및/또는 재생의 방법들을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61M 1/3693 (2013.01)

A61M 2202/0427 (2013.01)

A61M 2202/0462 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

혈액으로부터 적혈구를 제거하여 혈장을 제조하는 단계, 및 상기 혈장으로부터 백혈구를 분리하는 단계를 포함하는, 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적혈구는 혈액의 원심분리에 의해 제거되는, 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 적혈구는 상기 혈액 내로 혈장 증량제(plasma volume expander)를 도입함으로써 제거되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 적혈구는 상기 혈액 내로 상기 혈장 증량제를 도입한 후 자발적으로 침전되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 적혈구는 상기 혈액 내로 상기 혈장 증량제를 도입한 후 원심분리에 의해 침전되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈장 증량제는 헤타전분(hetastarch) 또는 펜타전분(pentastarch)인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈장은 상기 혈장 내 혈소판으로부터 백혈구를 분리하기에 충분한 시간동안 원심분리되어 혈소판-풍부 혈장(PRP)을 제조하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 혈장은 약 200xG 내지 약 500xG에서 원심분리되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 혈장은 약 300xG 내지 약 400xG에서 원심분리되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈장은 약 5분 내지 약 30분 동안 원심분리되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 혈장은 약 10분 내지 약 30분 동안 원심분리되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 혈장은 약 10분 내지 약 20분 동안 원심분리되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는

방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 혈장은 약 10분 내지 약 15분 동안 원심분리되는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 14

약 100xG 내지 약 500xG에서 약 10 분 내지 약 30 분 동안 혈액을 원심분리하여 PRP를 제조하는 단계를 포함하는, 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 약 100xG 내지 약 200xG에서 상기 혈액을 원심분리하는 단계를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 약 20분 내지 약 25분 동안 상기 혈액을 원심분리하는 단계를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 17

제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PRP를 완충하는 단계(buffering)를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 18

제7항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PRP를 저온보존하는 단계(cryopreserving)를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 PRP를 저온보존하는 단계는 상기 PRP를 냉동하는 단계(freezing)를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 PRP를 저온보존하는 단계는 상기 PRP를 냉동 건조하는 단계(freeze drying)를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 냉동 건조된 PRP를 실온에서 진공으로 저장하는 단계(storing)를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 22

제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈소판을 펠렛화(pellet)하기 위해 약 500xG 내지 약 4000xG에서 약 20분 내지 약 60분 동안 상기 PRP를 원심분리하는 단계, 및 생성된 상층액을 제거하는 단계를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 혈소판을 펠렛화하기 위해, 약 2000xG 내지 약 4000xG에서 약 10분 내지 약 20분 동안 상기 PRP를 원심분리하는 단계, 및 생성된 상층액을 제거하는 단계를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 약 2000xG에서 약 15분 동안 상기 PRP를 원심분리하는 단계를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제(buffer)에서 상기 혈소판을 재현탁하는 단계(resuspending)를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈소판을 저온보존하는 단계를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 혈소판을 저온보존하는 단계는 상기 혈소판을 냉동하는 단계를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 혈소판을 저온보존하는 단계는 상기 혈소판을 냉동 건조하는 단계를 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 냉동 건조된 PRP를 실온에서 진공으로 저장하는 단계(storing)를 더 포함하는 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액은 제대혈(cord blood)인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 제대혈은 인간 제대혈인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 32

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액은 태반 유래인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 혈액은 인간 태반 유래인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 34

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액은 제대혈인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 제대혈은 인간 제대혈인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 36

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액은 태반 유래인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 혈액은 인간 태반 유래인 것인 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2014년 12월 31일자에 출원된 미국 가출원 제 62/098,795의 이익을 향유하며, 그 개시내용은 전체로 본원에 참고로 포함된다.

[0002] 본 발명은 혈소판을 분리하는 방법, 예를 들어 제대혈(umbilical cord blood)로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 여기에 개시되는 방법은 혈소판-풍부 혈장(PRP)을 제조하는 방법을 포함한다.

배경 기술

[0003] 혈소판은 혈액의 표준 세포 성분이다. 매우 작을지라도, 혈소판은 잠재적으로 유익한 특성들과 함께, 다수의 인자들, 예를 들어, 성장 인자(growth factors)를 운반하는 다양한 형태의 소포(vesicles)를 함유하는 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 혈소판을 분리하는 방법, 예를 들어 제대혈(umbilical cord blood)로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 여기에 개시되는 방법은 혈소판-풍부 혈장(PRP)을 제조하는 방법을 포함한다.

과제의 해결 수단

[0005] 일 측면에서, 본 발명은 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 본 발명은 제대혈, 예를 들어, 인간 제대혈로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 상기 분리된 혈소판은 다양하게 응용되어 사용될 수 있으며, 예를 들어 자가(autologous) 또는 동종 이계(allogeneic)의 환경들에 있어서, 상처 치료(wound healing), 장기(organ) 수복(repair) 및/또는 재생(regeneration), 및/또는 조직(tissue) 수복 및/또는 재생의 방법들을 포함한다.

[0006] 특정 실시예들에서, 혈소판은 혈액으로부터 적혈구를 분리한 후에, 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어, 인간 제대혈로부터 분리된다. 특정 실시예들에서, 적혈구의 제거 후에 생성되는 혈장은 다른 혈장 성분들, 예를 들어 백혈구와 같은 세포 성분들과 혈장 내 혈소판을 분리하기 위해 가공된다.

[0007] 일 실시예에서, 적혈구는 원심분리를 통해 혈액으로부터 제거된다. 또 다른 실시예에서, 적혈구는 자발적으로든 원심분리를 통해서든 적혈구 침전을 야기하는 성분들을 포함하는 매체를 사용함으로써 혈액으로부터 제거된다. 특정 실시예에서, 그러한 매체는 혈장 증량제(plasma volume expander), 예를 들어 헤타전분(hetastarch) 또는 펜타전분(pentastarch)을 포함한다.

[0008] 일 실시예에서 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터 적혈구 제거 후에 생성되는 혈장은 상기 혈장에서 혈소판의 양을 풍부하게 하여 혈소판-풍부 혈장(PRP)을 제조하도록 가공된다. 예를 들어, 혈장은 백혈구가 고갈되고 상기 혈장의 혈소판 성분을 풍부하게 할 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장은 상기 혈장에서 혈소판으로부터 백혈구를 분리하기에 충분한 시간, 예를 들어 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30분, 예를 들어, 10-30 분, 10-20 분, 또는 10-15분 동안 200 내지 500xG, 예를 들어 300-400xG에서 원심분리될 수 있다. 이러한 실시예에서, 생성되는 백혈구가 고갈된 혈장은 혈소판-풍부 혈장(PRP)이다.

[0009] 특정 실시예들에서, 사용 또는 저장에 앞서, 상기 PRP는 목적하는 혈소판 농도가 되도록 가공될 수 있다. 일 실시예에서, 예를 들면 상기 PRP는 펠렛화하고 생성된 상층액을 제거하여, 목적하는 PRP 혈소판 농도를 얻기 위해, 2000xG 내지 4000xG에서, 예를 들어 2000xG에서 10-20 분, 예를 들어 15분 동안 원심분리될 수 있다. 다른 실시예들에서, 예를 들어, 상기 PRP는 목적하는 PRP 혈소판 농도를 얻기 위해, 500xG 내지 2000xG에서 20-60 분 동안 원심분리될 수 있다.

[0010] 특정 실시예들에서, 혈소판은 혈액으로부터 줄기 세포를 분리하기 위해 혈액이 가공된 후에, 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어, 인간 제대혈로부터 분리된다. 다른 특정한 실시예들에서, 혈소판은 앞선 줄기 세포 보존 없이, 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 혈액, 예를 들어 제대

혈, 예를 들어 인간 제대혈은 원심분리에 의해 PRP를 제조하기 위해 가공될 수 있으며, 원심분리는 예를 들어 100-500xG, 예를 들어 100-200xG를 통해 10-30 분, 예를 들어 20-25분 동안일 수 있다. 이어서, 생성되는 PRP는 펠렛화(pellet)하고 잔류 혈장으로부터 혈소판을 제거하기 위해 가공될 수 있다.

- [0011] 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 사용에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해, 분리되고, 사용에 앞서 완충제(buffer)에서 재현탁(resuspend)된다.
- [0012] 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 사용에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해, 분리되고, 사용에 앞서 완충제(buffer)에서 재현탁(resuspend)된다.
- [0013] 일 실시예에서, 상기 PRP는 생성 후에 즉시 사용될 수 있다. 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 사용에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어, 원심분리를 통해, 분리되고, 사용에 앞서 완충제에서 재현탁된다.
- [0014] 여전히 또 다른 실시예에서, 상기 PRP는 나중 사용을 위해 저장될 수 있다. 예를 들어, 상기 PRP는 나중 사용을 위해 냉동되거나 그렇지 않으면 저온보존될 수 있다. 다른 실시예들에서, 상기 PRP는 나중 사용을 위해 냉동 건조될 수 있다. 예를 들어, 냉동 건조된 PRP는 저온보존될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 냉동 건조된 PRP는 실온에서 진공으로 저장될 수 있다.
- [0015] 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해, 분리되고 저장에 앞서 완충제에서 재현탁된다. 예를 들어, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해, 분리되고 나중 사용을 위한 냉동 또는 저온보존에 앞서 완충제에서 재현탁된다. 다른 실시예들에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해, 분리되고 나중 사용을 위한 냉동 건조에 앞서 완충제에서 재현탁된다. 냉동 건조된 혈소판은, 예를 들어 저온보존될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 냉동 건조된 혈소판은 실온에서 진공으로 저장될 수 있다.
- [0016] 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 저장(storage)에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 저장에 앞서, 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고 저장, 예를 들어 저온보존에 적합한 완충액에서 재현탁된다.
- [0017] 특정 측면에서, 본 발명은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된 상기 분리된 PRP를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정한 다른 측면에서, 본 발명은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된 상기 분리된 혈소판을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0018] 특정 측면에서, 본 발명은 상기 분리된 PRP 및 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 (PDACs)를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된다. 특정한 다른 측면에서, 본 발명은 상기 분리된 혈소판 및 줄기 세포, 예를 들어 PDACs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된다.
- [0019] 일부 실시예에서, 상기 PRP 및 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 개체에 투여, 예를 들어 주입하기에 앞서 익스 비보(*ex vivo*)로 상기 조성물을 형성하기 위해 조합(combine)된다. 다른 실시예들에서, 상기 PRP는 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 두 번째 단계에서 PRP 투여 위치에 또는 PRP 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보(*in vivo*)로 상기 조성물을 형성한다. 여전히 다른 실시예들에서, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 PRP는 두 번째 단계에서 줄기 세포 투여 위치에 또는 줄기 세포 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다.
- [0020] 다른 실시예들에서, 상기 혈소판 및 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 개체에 투여, 예를 들어 주입되기 전에 앞서 상기 조성물을 익스 비보로 형성하기 위해 조합된다. 다른 실시예들에서, 상기 혈소판은 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 두 번째 단계에서 혈소판 투여 위치에 또는 혈소판 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다. 여전히 다른 실시예들에서, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 혈소판은 두 번째 단계에서 줄기 세포 투여 위치에 또는 줄기 세포 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다.
- [0021] 특정 실시예에서, 상기 PDAC는 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기 세포이다. 또 다른 특정 실시예에서, 상

기 PDAC는 CD200을 발현하고 HLA-G를 발현하지 않으며; 또는 CD73, CD105, 및 CD200을 발현하거나; 또는 CD200 및 OCT-4를 발현하거나; 또는 CD73 및 CD105을 발현하고 HLA-G를 발현하지 않는다. 여전히 다른 실시예들에서, 상기 PDAC는 CD44, CD90, HLA-A,B,C, 또는 ABC-p 중 하나 이상을 발현하고, 및/또는 CD45, CD117, CD133, KDR, CD80, CD86, HLH-DR, SSEA3, SSE4, 또는 CD38 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 특정 실시예들에서, 상기 태반 줄기 세포는 면역 세포의 활성을 억제, 예를 들어 T 세포의 증식을 억제한다.

[0022] 일부 실시예들에서, 상기 조성물 내 PRP 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 부피 비는 약 10:1 내지 1:10이다. 일부 실시예들에서, 상기 조성물 내 PRP 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 부피 비는 약 1:1이다. 일부 실시예들에서, 상기 PRP 중 혈소판의 수 대비 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 수의 비는 약 100:1 내지 1:100이다. 일부 실시예들에서, 상기 PRP 중 혈소판의 수 대비 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 수의 비는 약 1:1이다.

[0023] 특정 측면에서, 본 발명은 기질(matrix), 하이드로겔(hydrogel) 또는 스캐폴드(scaffold), 및 상기 분리된 PRP를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정 다른 측면에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 및 상기 분리된 혈소판을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 천연 기질(natural matrix), 예를 들어 양막 물질(amniotic membrane material) 등의 태반 생체물질(placental biomaterial)을 포함한다.

[0024] 특정 측면에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 상기 분리된 PRP 및 줄기 세포, 예를 들어 PDACs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정 다른 측면에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 상기 분리된 혈소판 및 줄기 세포, 예를 들어 PDACs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 천연 기질, 예를 들어 양막 물질 등의 태반 생체물질을 포함한다.

[0025] 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물의 PRP는 자가(autoologous) PRP이다. 일부 실시예들에서, 상기 조성물의 혈소판은 자가 혈소판이다. 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물의 PRP는 동종 이계(allogeneic) PRP이다. 일부 실시예들에서, 상기 조성물의 혈소판은 동종 이계 혈소판이다.

[0026] 일부 실시예들에서, 상기 PRP는 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터 유래된다. 일부 실시예들에서, 상기 혈소판은 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터 유래된다. 다른 실시예들에서, 상기 PRP는 태반 관류액(placental perfusate), 예를 들어 인간 태반 관류액으로부터 유래된다. 다른 실시예들에서, 상기 혈소판은 태반 관류액, 예를 들어 인간 태반 관류액으로부터 유래된다.

[0027] 특정 측면에서, 본 발명은 개체에서 질병, 장애 또는 건강 상태를 치료하는 용도의 상기 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 상처 치료가 필요한 개체에게 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 상처 치료를 촉진하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 조직 또는 장기 수복 또는 재생이 필요한 개체에 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 조직 또는 장기 수복 또는 재생을 촉진하는 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 본 발명은 골 수복 또는 재생이 필요한 개체에 본 발명에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 골 수복 또는 재생의 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 명시된 수치를 언급할 때, 용어 "약(about)"은 상기 명시된 수치의 플러스 또는 마이너스 10% 이내의 값을 나타낸다.

[0029] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 여기에 설명되는 상기 태반 줄기 세포를 언급할 때, 용어 "양(amount)"은 태반 세포들의 특정 수를 의미한다.

[0030] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "줄기 세포(stem cell)"는 줄기 세포의 적어도 하나의 속성, 예를 들어 마커 또는 하나 이상 유형의 줄기 세포와 관련된 유전자 발현 프로파일을 갖는 세포를 정의하며; 속성은 배양 시 적어도 10-40 배로 복제하는 능력; 다분화능(multipotency), 예를 들어 인 비트로(*in vitro*), 인 비로(*in vivo*) 또는 양자 모두에서 3 배엽(germ layer) 중 하나 이상의 세포로 분화하는 능력; 성체(즉, 분화된) 세포 특성의 결핍 등을 나타냄.

[0031] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "유래된(derived)"은 분리되거나(isolated from) 또는 달리 정제된 것을 의미한다. 예를 들어, 태반 유래된 부착 세포(placental derived adherent cells)는 태반으로부터 분리된다. 용어 "유래된"은 조직, 예를 들어 태반으로부터 직접적으로 분리된 세포로부터 배양된 세포들, 및 1차 분리

물(primary isolates)로부터 배양되거나 또는 확장된(expanded) 세포들을 포함한다.

- [0032] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, "면역 조직화(immunolocalization)"는 예를 들어 유세포 분석법(flow cytometry), 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting), 자성 세포 분류(magnetic cell sorting), 제자리 혼성화(in situ hybridization) 등에서 면역 단백질, 예를 들어 항체 또는 이의 절편을 사용하여 화합물, 예를 들어 세포 마커의 탐지를 의미한다.
- [0033] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "SH2"는 마커 CD105 상의 에피토프(epitope)와 결합하는 항체를 나타낸다. 따라서, SH2⁺ 로 언급되는 세포는 CD105⁺이다.
- [0034] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "SH3" 및 SH4"는 마커 CD73 상에 존재하는 에피토프와 결합하는 항체들을 나타낸다. 따라서, SH3⁺ 및/또는 SH4⁺ 로 언급되는 세포들은 CD73⁺이다.
- [0035] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 예를 들어 상기 줄기 세포를 수집 및/또는 배양하는 동안 상기 줄기 세포가 자연적으로 결합하고 있는 다른 세포들의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가 제거되면, 세포, 예를 들어 PDACs는 "분리"된다.
- [0036] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포의 분리된 개체군(isolated population of cells)"은 세포 개체군이 수득되거나 유래된 조직, 예를 들어 태반의 다른 세포들로부터 실질적으로 분리된 세포 개체군을 의미한다. 일부 실시예들에서, 예를 들어 상기 줄기 세포의 개체군을 수집 및/또는 배양하는 동안 상기 줄기 세포 개체군이 자연적으로 결합하고 있는 세포들의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 적어도 99%가 제거되면, 예를 들어, 줄기 세포 개체군이 "분리"된다.
- [0037] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "태반 줄기 세포(placental stem cell)"는 형태(morphology), 세포 표면 마커, 또는 1차 배양 후 관(passages)의 수에 관계없이, 포유류의 태반으로부터 유래된, 예를 들어 분리된 줄기 세포 또는 전구 세포(progenitor cell)를 나타내며, 이는 조직 배양 기질(tissue culture substrate) (예를 들어, 조직 배양 플라스틱 또는 피브로벡틴-코팅된 조직 배양 플레이트)에 부착하는 것이다. 그러나, 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "태반 줄기 세포"는 영양막(trophoblast), 영양막세포층(cytotrophoblast), 배아 생식 세포(embryonic germ cell), 또는 배아 줄기 세포(embryonic stem cell)를 나타내지 않으며, 통상의 기술자는 이들 세포들을 이해할 것이다. 용어 "태반 줄기 세포" 및 "태반에서 유래된 줄기 세포"는 교대해서 사용될 수 있다. 여기에 다르게 명시하지 않는 한, 용어 "태반"은 탭줄(umbilical cord)을 포함한다. 특정 실시예들에서, 여기에 개시되는 상기 태반 줄기 세포는 인 비트로 다분화능(즉, 상기 세포가 분화 조건에서 인 비트로로 분화함), 인 비보 분화능(즉, 상기 세포가 인 비보로 분화함)이며, 또는 양자 모두에 해당한다.
- [0038] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, 마커가 상기의 배경기술, 예를 들어 면역 조직화에 의해, 예를 들어 유세포 분석법에 의해; 또는 RT-PCR 등에 의해 검출될 수 있을 때, 줄기 세포는 특정 마커에 대하여 "양성"이다. 예를 들어, 세포 또는 세포 개체군은 예를 들어 CD73이 상기 세포 상에, 또는 상기 세포 개체군에서 배경기술 (예를 들어, 동기준 비교군(isotype control)과 비교하여) 또는 임의의 분석법에 대한 실험적 음성 조절군보다 검출가능한 더 큰 양으로 검출된다면 CD73에 대하여 양성으로 설명된다. 예를 들어 항체-매개된 검출의 내용의 문맥에서, 특정 세포 표면 마커가 존재한다는 지시로서 "양성"은 상기 마커가 그 마커에 특이적인 항체, 예를 들어 형광-표지된 항체를 사용하여 검출가능한 것을 의미하며; "양성"은 또한 세포 또는 세포 개체군이 마커를 예를 들어, 세포 계수기(cytometer), ELISA 등에서 신호를 생성하는 양, 즉 상기 배경기술에서 검출 가능한 양으로 나타내는 것을 의미한다. 예를 들어, 한 세포가 CD105에 항체 특이적으로 검출하도록 표지되었을 때, 그 세포는 "CD105⁺"이며, 상기 항체로부터 신호는 대조군(예를 들어, 배경기술)보다 더 높게 검출가능하다. 역으로, 동일한 문맥에서 "음성"은 상기 세포 표면 마커가 배경기술과 비교하여 그 마커에 특이적인 항체를 사용하여 검출할 수 없는 것을 의미한다. 예를 들어, 세포 또는 세포 개체군이 CD34에 특이적인 항체로 검출가능하도록 표지되지 않는 경우, 그 세포 또는 세포 개체군은 "CD34⁻"이다. 여기에 달리 명시되지 않는 한, 분화 클러스터("CD") 마커는 항체들을 사용하여 검출된다. 예를 들어, OCT-4는 존재하는 것으로 결정될 수 있으며, OCT-4에 대한 mRNA가 RT-PCR, 예를 들어 30 순환 동안 사용하여 검출가능하다면, 세포는 OCT-4⁺이다. 세포는 또한 마커가 상기 세포를 적어도 하나의 다른 세포 유형과 구별하는 데 사용될 수 있다면, 또는 상기 세포에 의해 표현되거나 발현되는 세포를 선별하거나 분리하는 데 사용될 수 있다면 그 마커에 대해 양성이다.
- [0039] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, "면역 조절(immunomodulation)" 및 "면역 조절의(immunomodulatory)"는

전신적으로든 또는 국소적으로든, 면역 반응에서 검출 가능한 변화를 야기하는 것, 또는 야기하는 능력 (capacity)을 갖는 것, 및 면역 반응에서 검출 가능한 변화를 야기하는 능력 (ability)를 의미한다.

[0040] 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, "면역 억제(immunosuppression)" 및 "면역 억제의(immunosuppressive)"는 전신적으로든 또는 국소적으로든, 면역 반응에서 검출 가능한 변화를 야기하는 것, 또는 야기하는 능력 (capacity)을 갖는 것, 및 면역 반응에서 검출 가능한 변화를 야기하는 능력(ability)을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 1. 혈소판 및 혈소판-풍부 혈장을 수득하는 방법(methods of obtaining platelets and platelet rich plasma)

[0042] 일 측면에서, 본 발명은 혈액으로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 본 발명은 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈, 또는 태반, 예를 들어 인간 태반으로부터, 예를 들어 태반 관류액으로부터 혈소판을 분리하는 방법을 제공한다.

[0043] 본 개시에 따른 방법을 이용하여 분리된 혈소판의 공급원은 인간 또는 동물의 전혈 공급으로부터 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 PRP 및 분리된 혈소판은 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈 또는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 인간 태반으로부터 얻어진 혈소판인, 혈소판 및/또는 혈장의 자가 공급원, 동종 이계 공급원, 단일 공급원, 또는 공동 공급원으로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 분리 방법에 사용되는 혈액의 공급원이 되는 기증자는 이전에 헤파린, tPA, 또는 아스피린 등의 혈전 용해제(thrombolytic agent)로 치료받은 적이 없는 기증자일 수 있다. 일부 실시예들에서, 그러한 기증자는 채혈 전 최소 2시간, 1일, 2주, 또는 1개월 동안 혈전 용해제를 받은 적이 없다.

[0044] 일 실시예에서, 전혈은 채혈 주사기를 사용하여 기증자로부터 채혈될 수 있다. 채혈되는 혈액의 양은 예를 들어 목적하는 혈소판의 양 및 기증자의 건강을 포함하는 많은 인자들에 따라 다를 수 있다. 임의의 적합한 양의 혈액이 채혈될 수 있다. 예를 들어, 약 30 내지 60 ml의 전혈이 채혈될 수 있다. 실시예에서, 약 11 ml의 혈액이 산-시트레이트-포스페이트 또는 시트레이트-포스페이트-텍스트로스 용액 등의 항응고제 약 5 ml를 함유하는 주사기로 채집될 수 있다. 상기 주사기는 성분 채집 바늘(apheresis needle)에 부착될 수 있으며, 상기 항응고제로 채워질 수 있다. 혈액은 표준 무균 실험을 이용하여 상기 기증자로부터 채혈될 수 있다. 일부 실시예들에서, 안베솔(ambesol), 벤조카인(benzocaine), 리도카인(lidocaine), 프로카인(procaine), 부피비카인(bupivacaine), 또는 당업계에 알려진 적절한 마취제 등의 국소 마취제가 상기 주입 지역을 마취시키기 위해 사용될 수 있다.

[0045] 특정 실시예들에서, 상기 혈소판은 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터 분리된다. 제대혈은 당업계에 잘 알려진 표준적인 방법들을 이용하여 수득될 수 있다.

[0046] 특정 실시예들에서, 혈소판은 태반, 예를 들어 인간 태반으로부터, 예를 들어 태반 관류액으로부터 분리된다. 태반 관류액의 분리 방법의 한 실시예가 하기에 개시된다.

[0047] 상기 태반, 예를 들어 인간 태반, 예를 들어 인간의, 10달을 다 채운 태반은 실온에서 멸균된, 절연 용기에 놓여야 하고, 출생 후 4시간 이내에 실험실로 전달되어야 한다. 검사 시에, 상기 장기의 절편 또는 제대 혈관의 박리 등 물리적 손상의 증거가 있다면 상기 태반은 폐기된다. 임의적으로, 그러한 전달에 앞서, 상기 태반 및 이에 붙어있는 임의의 탯줄은 방혈될 수 있고 또는 부분적으로 방혈될 수 있다.

[0048] 상기 태반은 멸균된 용기에서 2 내지 20 시간 동안 실온 (23° +/-2°C)으로 유지 또는 냉장 (4°C)된다. 주기적으로, 상기 태반은 25° +/-3°C에서 멸균 식염수에 담궈지고 씻겨 육안으로 보이는 표면 혈액이나 잔해를 제거한다. 상기 탯줄은 상기 태반으로의 주입으로부터 약 5 cm를 잘라지고 상기 제대 혈관은 태반을 양방향으로 관류시키고 유출액을 회수할 수 있도록 하는 멸균된 유체 경로에 연결된 테플론 또는 폴리프로필렌 카테터로 연결된다.

[0049] 상기 태반은 세포의 동원(recruitment)을 위한 생리학적으로 호환가능한 환경을 모방하고 유지하는 조건 하에 유지된다. 상기 캐놀라가 2U/ml 헤파린 (Elkins-Sinn, N.J.)을 함유하는 IMDM 무혈청 배지(GibcoBRL, NY)로 플러시(flush)된다. 태반의 관류는 분당 50 mL의 속도로 수행된다. 절차 과정 동안, 상기 태반은 관류 과정을 보조하고 세포 물질의 회복을 돕기 위해 부드럽게 마사지된다. 유출액은 중력 배수 및 동맥 캐놀라를 통한 흡입 모두에 의해 관류 회로로부터 수집된다.

[0050] 상기 관류 및 수집 과정은 회수된 유핵 세포의 수가 100/ μL 이하가 될 때까지 반복될 수 있다. 상기 관류액은

본원에 의해 개시되는 혈소판 분리를 위해 공동으로 이용(pooled and used)될 수 있다.

- [0051] 특정 실시예들에서, 혈소판은 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터, 또는 태반, 예를 들어 인간 제대혈, 예를 들어 태반 관류액으로부터 상기 혈액에서 적혈구가 제거된 후에 분리된다. 특정 실시예에서, 적혈구 제거 후에, 생성되는 혈장은 혈장 내 혈소판을 다른 혈장 성분들, 예를 들어 백혈구 등의 세포 성분들로부터 분리하기 위해 가공된다.
- [0052] 일 실시예에서, 적혈구는 원심분리를 통해 제거된다. 또 다른 실시예에서, 적혈구는 자발적으로든 원심분리를 통해서든 적혈구 침전을 야기하는 성분들을 포함하는 배지를 이용함으로써 혈액으로부터 제거된다. 특정 실시예에서, 그러한 배지는 혈장 증량제, 예를 들어 헤타전분 또는 펜타전분을 포함한다.
- [0053] 적혈구가 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈, 또는 태반, 예를 들어 인간 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터 적혈구가 제거된 후에, 생성되는 혈장은 혈장 내 혈소판이 풍부하게 되어 혈소판-풍부 혈장 (PRP)이 제조되도록 가공된다. 예를 들어, 혈장은 백혈구가 고갈될 수 있고 그에 따라 상기 혈장의 혈소판 성분이 풍부해질 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 혈장은 원심분리될 수 있으며, 예를 들어 200 내지 500xG, 예를 들어 300-400xG에서 원심분리될 수 있으며, 상기 혈장 내 혈소판으로부터 백혈구를 분리하기에 충분한 시간 동안, 예를 들어 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30 분, 예를 들어 10-30 분, 10-20 분, 또는 10-15 분동안 원심분리될 수 있다. 그러한 실시예에서, 생성되는 백혈구가 고갈된 혈장은 혈소판-풍부 혈장(PRP)이다.
- [0054] 특정 실시예들에서, 사용 또는 저장에 앞서, 상기 PRP는 목적하는 혈소판 농도가 되도록 가공될 수 있다. 일 실시예에서, 예를 들어, 상기 PRP는 2000xG 내지 4000xG, 예를 들어 2000xG에서 10-20 분, 예를 들어 15 분 동안 원심분리되어 목적하는 PRP 혈소판 농도를 제조할 수 있다. 다른 실시예들에서, 예를 들어 상기 PRP는 500xG 내지 2000xG에서 20-60 분 동안 원심분리되어 목적하는 PRP 혈소판 농도를 생산할 수 있다.
- [0055] 특정 실시예들에서, 혈소판은 혈액으로부터 줄기 세포를 분리하기 위해 혈액이 가공된 후에, 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어, 인간 제대혈로부터, 또는 태반, 예를 들어 인간 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터 분리된다. 다른 특정한 실시예들에서, 혈소판은 앞선 줄기 세포 보존 없이, 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈로부터, 또는 태반, 예를 들어 인간 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 혈액, 예를 들어 제대혈, 예를 들어 인간 제대혈, Eh는 태반, 예를 들어 인간 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 태반은 원심분리에 의해 PRP를 제조하기 위해 가공될 수 있으며, 원심분리는 예를 들어 100-500xG, 예를 들어 100-200xG를 통해 10-30 분, 예를 들어 20-25분 동안일 수 있다. 이어서, 생성되는 PRP는 펠렛화하고 잔류 혈장으로부터 혈소판을 제거하기 위해 가공될 수 있다.
- [0056] 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 사용에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지에서부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고 사용에 앞서 완충액에서 재현탁된다.
- [0057] 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 사용에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지에서부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고 사용에 앞서 완충액에서 재현탁된다.
- [0058] 일 실시예에서, 상기 PRP는 생성 후에 즉시 사용될 수 있다. 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 사용에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지에서부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고, 사용에 앞서 완충액에서 재현탁된다.
- [0059] 특정 실시예들에서, 상기 PRP 또는 재현탁된 혈소판은 생체 pH로 알칼린 완충제를 사용하여 완충될 수 있다. 상기 완충제는 약 6.5 내지 약 8.0의 생체 pH로 상기 PRP 또는 재현탁된 혈소판을 조절할 수 있는 HEPES, TRIS, 1가 염기 인산염, 1가 염기 바이카보네이트, 또는 이들의 임의의 적합한 조합 등의 생체 호환성 완충제일 수 있다. 특정 실시예들에서, 상기 생체 pH는 약 7.3 내지 약 7.5로 조정될 수 있으며, 더 특정적으로는 약 pH7.4로 조정될 수 있다. 특정 실시예들에서, 상기 완충제는 8.4% 소듐 바이카보네이트 용액(sodium bicarbonate solution)일 수 있다. 특정 실시예에서, 전혈로부터 분리된 각 cc의 PRP에 대하여, 0.05 cc의 8.4% 소듐 바이카보네이트가 첨가될 수 있다.
- [0060] 여전히 또 다른 실시예에서, 상기 PRP는 나중 사용을 위해 저장될 수 있다. 예를 들어, 상기 PRP는 나중 사용을 위해 냉동되거나 그렇지 않으면 저온보존될 수 있다. 특정 실시예에서, DMSO, 글리세롤, 또는 EPILIFE™ Cell Freezing Medium (Cascade Biologics) 등의 저온보존제가 냉동에 앞서 추가된다.
- [0061] 다른 실시예들에서, 상기 PRP는 나중 사용을 위해 냉동 건조될 수 있다. 예를 들어, 냉동 건조된 PRP는 저온보존될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 냉동 건조된 PRP는 실온에서 진공으로 저장될 수 있다.

- [0062] 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고 저장에 앞서 완충액에서 재현탁된다. 예를 들어, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해, 분리되고 나중 사용을 위한 냉동 또는 저온보존에 앞서 완충액에서 재현탁될 수 있다. 특정 실시예에서, DMSO, 글리세롤, 또는 EPILIFE™ Cell Freezing Medium (Cascade Biologics) 등의 저온보존제가 냉동에 앞서 추가된다.
- [0063] 다른 실시예들에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고 나중 사용을 위한 냉동 건조에 앞서 완충액에서 재현탁된다. 예를 들어, 냉동 건조된 혈소판은 저온보존될 수 있다. 또 다른 예에서, 냉동 건조된 혈소판들은 실온에서 진공으로 저장될 수 있다.
- [0064] 특정 실시예들에서, 상기 PRP는 저장에 앞서 완충된다. 또 다른 실시예에서, 상기 PRP 중 혈소판은 상기 혈장의 나머지로부터 예를 들어 원심분리를 통해 분리되고 저장에 앞서, 저장, 예를 들어 냉동보존에 적합한, 완충액에서 재현탁된다.
- [0065] 2. 혈소판 및 혈소판-풍부 혈장을 포함하는 조성물
- [0066] 특정 측면에서, 본 발명은 여기에 개시된 방법들을 통해 제조된 분리된 PRP를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시예들에서, 본 발명이 개시하는 조성물은 PRP를 포함하며, 상기 PRP는 PRP를 생성하는데 사용된 전혈, 예를 들어 가공되지 않은 전혈 중 혈소판의 농도보다 적어도 1.1 배 더 큰 농도의 혈소판 세포를 포함하는 것이다. 일부 실시예들에서, 본 발명이 개시하는 조성물은 PRP를 포함하며, 상기 PRP는 PRP를 생성하는데 사용된 전혈, 예를 들어 가공되지 않은 전혈 중 혈소판의 농도보다 약 1.1 배 내지 약 10배 더 큰 농도의 혈소판 세포를 포함하는 것이다. 일부 실시예들에서, 본 발명이 개시하는 조성물은 PRP를 포함하며, 상기 PRP는 PRP를 생성하는데 사용된 전혈, 예를 들어 가공되지 않은 전혈 중 혈소판의 농도보다 약 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10배, 또는 10배 이상 더 큰 농도의 혈소판 세포를 포함하는 것이다.
- [0067] 특정한 다른 측면들에서, 본 발명은 여기에 개시된 방법들을 통해 제조된 혈소판을 포함하는 조성물을 개시한다. 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물은 혈소판 세포를 포함하며, 상기 혈소판 세포의 농도는 분리된 혈소판을 생성하는데 사용된 전혈, 예를 들어 가공되지 않은 전혈 중 혈소판의 농도보다 적어도 1.1배 더 큰 농도이다. 일부 실시예들에서, 본 발명이 개시하는 조성물은 혈소판 세포를 포함하며, 상기 혈소판 세포는 상기 분리된 혈소판을 생성하는데 사용된 전혈, 예를 들어 가공되지 않은 전혈 중 혈소판의 농도보다 약 1.1 배 내지 약 10배 더 큰 농도이다. 일부 실시예들에서, 본 발명이 개시하는 조성물은 혈소판 세포를 포함하며, 상기 혈소판 세포의 농도는 상기 분리된 혈소판을 생성하는데 사용된 전혈, 예를 들어 가공되지 않은 전혈의 혈소판 농도보다 약 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10배, 또는 10 배 이상 더 큰 농도이다.
- [0068] 통상적으로, 1 마이크로리터의 전혈은 140,000 내지 500,000 개의 혈소판을 포함한다. 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물 내 상기 혈소판 농도는 마이크로리터당 약 150,000 내지 약 2,000,000 개 혈소판이다. 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물 내 상기 혈소판 농도는 마이크로리터당 약 150,000, 200,000, 300,000, 400,000, 500,000, 600,000, 700,000, 800,000, 900,000, 1,000,000, 1,100,000, 1,200,000, 1,300,000, 1,400,000, 1,500,000, 1,600,000, 1,700,000, 1,800,000, 1,900,000, 또는 2,000,000 개 혈소판이다. 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물 내 상기 혈소판 농도는 마이크로리터당 약 2,500,000 내지 약 5,000,000, 또는 약 5,000,000 내지 약 7,000,000 개 혈소판이다.
- [0069] 특정 측면에서, 본 발명은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된, 분리된 PRP를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정한 다른 측면들에서, 본 발명은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된, 분리된 혈소판을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0070] 특정 측면에서, 본 발명은 분리된 PRP 및 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 (PDACs)를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된다. 특정한 다른 측면들에서, 본 발명은 상기 분리된 혈소판 및 줄기 세포, 예를 들어 PDACs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여, 예를 들어 주입, 예를 들어 국소 주입에 의해 투여되기 위해 제제화된다.
- [0071] 일부 실시예들에서, 상기 PRP 및 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 개체에 투여, 예를 들어 주입하기에 앞서 익스 비보로 상기 조성물을 형성하기 위해 조합된다. 다른 실시예들에서, 다른 실시예들에서, 상기 PRP는

첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 두 번째 단계에서 PRP 투여 위치에 또는 PRP 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다. 여전히 다른 실시예들에서, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 PRP는 두 번째 단계에서 줄기 세포 투여 위치에 또는 줄기 세포 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다.

[0072] 다른 실시예들에서, 상기 혈소판 및 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 개체에 투여, 예를 들어 주입되기 전에 앞서 상기 조성물을 익스 비보로 형성하기 위해 조합된다. 다른 실시예들에서, 상기 혈소판은 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 두 번째 단계에서 혈소판 투여 위치에 또는 혈소판 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다. 여전히 다른 실시예들에서, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포는 첫 번째 단계에서 개체에 투여, 예를 들어 주입되며, 상기 혈소판은 두 번째 단계에서 줄기 세포 투여 위치에 또는 줄기 세포 투여 위치 주변으로 상기 개체에 투여, 예를 들어 주입되어, 인 비보로 상기 조성물을 형성한다.

[0073] 본 발명에 따른 조성물 및 방법에 사용하는 태반 줄기 세포는 여기 및 미국 특허 번호 7,311,904; 7,311,905; 7,468,276; 8,057,788; 및 8,202,703에 개시되며, 이들의 개시들은 참조에 의해 전체로 여기에 포함된다.

[0074] 특정 실시예에서, 상기 PDAC는 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기 세포이다. 또 다른 특정 실시예에서, 상기 CD10⁺, CD34⁻, CD105⁺, CD200⁺ 태반 줄기 세포는 추가적으로 CD45⁻ 또는 CD90⁺이다. 또 다른 특정 실시예에서, 그러한 세포는 추가적으로 CD80⁻ 및/또는 CD86⁻이다.

[0075] 특정 실시예들에서, 상기 태반 줄기 세포는 유세포 분석법에 의해 검출된 바와 같이, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 및 CD200⁺이고, 및 CD38⁻, CD45⁻, CD80⁻, CD86⁻, CD133⁻, HLA-DR, DP, DQ⁻, SSEA3⁻, SSEA4⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, HLA-A,B,C⁺, PDL1⁺, ABC-p⁺, 및/또는 OCT-4⁺ 중에서 하나 이상이다. 다른 실시예들에서, 상기에 개시된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 세포들 중 임의의 것은 추가적으로 CD29⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD54⁺, SH3⁺ 또는 SH4⁺ 중 하나 이상이다. 또 다른 특정한 실시예에서, 상기 세포들은 추가적으로 CD44⁺이다. 상기 분리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 줄기 세포 중 임의의 것의 또 다른 특정 실시예에서, 상기 세포들은 추가적으로 CD117⁻, CD133⁻, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, 또는 Programmed Death-1 Ligand (PDL1)⁺ 중 하나 이상 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0076] 또 다른 실시예에서, 상기 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 세포들은 추가적으로 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherin^{low}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, 또는 Programmed Death-1 Ligand (PDL1)⁺ 중 하나 이상, 또는 이들의 임의의 조합이다. 또 다른 실시예에서, 상기 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 세포들은 추가적으로 CD13⁺, CD29⁺, CD33⁺, CD38⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD54/ICAM⁺, CD62E⁻, CD62L⁻, CD62P⁻, SH3⁺ (CD73⁺), SH4⁺ (CD73⁺), CD80⁻, CD86⁻, CD90⁺, SH2⁺ (CD105⁺), CD106/VCAM⁺, CD117⁻, CD144/VE-cadherin^{low}, CD184/CXCR4⁻, CD200⁺, CD133⁻, OCT-4⁺, SSEA3⁻, SSEA4⁻, ABC-p⁺, KDR⁻ (VEGFR2⁻), HLA-A,B,C⁺, HLA-DP,DQ,DR⁻, HLA-G⁻, 및 Programmed Death-1 Ligand (PDL1)⁺이다.

[0077] 또 다른 특정 실시예에서, 여기에 개시된 임의의 상기 태반 줄기 세포는 추가적으로 유세포 분석법에 의해 검출된 바와 같이 ABC-p⁺이며, 또는 역전사 효소 중합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR)에 의해 검출된 바와 같이 OCT-4⁺ (POU5F1⁺)이며, 여기서 ABC-p는 (유방암 저항 단백질 (BCRP) 및 미토산트론 저항 단백질 (MXR)로도 알려진) 태반-특이적 ABC 수송 단백질이며, OCT-4는 옥타머-4 단백질 (POU5F1)이다.

[0078] 또 다른 특정 실시예에서, 본 발명에 개시된 상기 태반 줄기 세포 중 임의의 것은 추가적으로 유세포 분석법에 의해 검출된 바와 같이, SSEA3⁻ 또는 SSEA4⁻이며, 여기서 SSEA3는 단계 특이적 태아 항원 3(Stage Specific

Embryonic Antigen 3)이며, 그리고 SSEA4는 단계 특이적 태아 항원 4이다. 또 다른 특정 실시예에서, 본 발명에 개시된 상기 태반 줄기 세포 중 임의의 것은 추가적으로 SSEA3⁻ 및 SSEA4⁻이다.

[0079] 또 다른 특정 실시예에서, 본 발명에 개시된 상기 태반 줄기 세포 중 임의의 것은 추가적으로 MHC-I⁺ (예를 들어, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (예를 들어, HLA-DP,DQ,DR⁻) 또는 HLA-G⁻ 중 하나 이상이다. 또 다른 특정 실시예에서, 본 발명에 개시된 상기 태반 줄기 세포 중 임의의 것은 추가적으로 MHC-I⁺ (예를 들어, HLA-A,B,C⁺), MHC-II⁻ (예를 들어, HLA-DP,DQ,DR⁻) 및 HLA-G⁻ 중 하나 이상이다.

[0080] 여전히 또 다른 특정 실시예에서, 상기 PDAC는 CD200을 발현하고 HLA-G를 발현하지 않으며; 또는 CD73, CD105, 및 CD200를 발현하거나; 또는 CD200 및 OCT-4를 발현하거나; 또는 CD73 및 CD105를 발현하고 HLA-G를 발현하지 않는다. 여전히 다른 실시예들에서, 상기 PDAC는 CD44, CD90, HLA-A,B,C, 또는 ABC-p 중 하나 이상을 발현하고, 및/또는 CD45, CD117, CD133, KDR, CD80, CD86, HLH-DR, SSEA3, SSE4, 또는 CD38 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 특정 실시예들에서, 상기 태반 줄기 세포는 면역 세포의 활성을 억제, 예를 들어 T 세포의 증식을 억제한다.

[0081] 일부 실시예들에서, 상기 조성물 내 PRP 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 부피 비는 약 10:1 내지 1:10이다. 일부 실시예들에서, 상기 조성물 내 PRP 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 부피 비는 약 1:1이다. 일부 실시예들에서, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 수 대비 PRP 내 상기 혈소판의 수의 비는 약 100:1 내지 1:100이다. 일부 실시예들에서, 상기 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 수 대비 PRP 내 상기 혈소판의 수의 비는 약 1:1이다.

[0082] 일부 실시예들에서, PRP 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 부피비는 약 10:1, 9.5:1, 9:1, 8.5:1, 8:1, 7.5:1, 7:1, 6.5:1, 6:1, 5.5:1, 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 1:5, 1:5.5, 1:6, 1:6.5, 1:7, 1:7.5, 1:8, 1:8.5, 1:9, 1:9.5, 또는 1:10이다. 일부 실시예들에서, PRP 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포의 부피비는 약 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1.95, 또는 1:100이다. 특정 실시예들에서, 상기 PRP 내 혈소판의 수 대 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 수의 비는 약 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1.95, 또는 1:100이다.

[0083] 여기서 제공되는 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 및 PRP 또는 혈소판을 포함하는 상기 조성물들은 치료적으로 유효한 양의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 또는 PRP 또는 혈소판, 또는 이들 모두를 포함한다. 상기 조합(combination) 조성물은 적어도 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 또는 1×10^{11} 개의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 혈소판, 예를 들어 PRP 내 혈소판, 또는 이들 모두를 포함할 수 있거나, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 또는 1×10^{11} 개 이하의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 혈소판, 예를 들어 PRP 내 혈소판, 또는 이들 모두를 포함할 수 있다.

[0084] 일 실시예에서, 그러한 조성물은 약 3억 개의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함한다. 특정한 다른 실시예들에서, 그러한 조성물은 100만 개 내지 100억 개의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 1000만 개 내지 10억 개의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 또는 1억 개 내지 5억 개의 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함한다.

[0085] 특정 측면에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 및 상기 분리된 PRP를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정한 다른 측면들에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 및 상기 분리된 혈소판을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 천연 기질, 예를 들어 양막 물질 등의 태반 생체물질을 포함한다.

- [0086] 특정 측면에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 상기 분리된 PRP 및 줄기 세포, 예를 들어 PDACs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다. 특정 다른 측면들에서, 본 발명은 기질, 하이드로겔 또는 스캐폴드, 상기 분리된 혈소판 및 줄기 세포, 예를 들어 PDACs를 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시예들에서, 그러한 조성물은 개체에 투여되기 위해 제제화된다.
- [0087] 특정 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물은 천연 기질, 예를 들어 양막 물질 등의 태반 생체물질을 포함한다. 그러한 양막 물질은 예를 들어, 포유류 태반으로부터 직접적으로 박리된 양막; 고정된 또는 열-처리된 양막, 실질적으로 건조된 (즉, 20% 미만의 H₂O) 양막, 용모막(chorionic membrane), 실질적으로 건조된 용모막, 실질적으로 건조된 양막 및 용모막 등일 수 있다. 특정 실시예들에서, PRP 또는 분리된 혈소판, 및 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포가 추가될 수 있는, 태반 생체물질은 여기에 전체적으로 포함되는, Hariri, U.S. 공개공보 No. 2004/0048796에 설명된다. 추가적으로 PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포가 추가될 수 있는, 태반 생체물질은 여기에 전체적으로 포함되는, Hariri, U.S. 공개공보 No. 2008//0181935에 설명된다.
- [0088] 다른 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물은 하이드로겔 용액, 예를 들어 주입에 적합한 하이드로겔 용액에 현탁된 PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함한다. 그러한 조성물을 위한 적합한 하이드로겔은 예를 들어, RAD16 등의 자기 조립 펩타이드(self-assembling peptides)를 포함한다. 일 실시예에서, PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로, 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함하는 하이드로겔 용액은 이식(implantation)용 기질을 형성하기 위해, 예를 들어 주형(mold)에서 경화되도록 허용될 수 있다. 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함하는 실시예들에서, 그러한 기질은 또한 이식에 앞서 유사분열(mitotically)로 확장되도록 배양될 수 있다. 특정 실시예들에서, 상기 하이드로겔은 예를 들어, 겔을 형성하기 위해 물 분자를 가둬두는 삼차원의 개방 격자(open lattice)를 형성하도록 공유결합, 이온결합, 또는 수소결합을 통해 크로스 링크되는 (천연 또는 합성의) 유기 고분자이다. 하이드로겔-형성 물질은 예를 들어 알지네이트 및 그의 염, 펩타이드, 폴리포스파진(polyphosphazines), 및 폴리아크릴레이트 등의 이온적으로 크로스 링크된 다당류, 또는 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글리콜 블록 코폴리머 등의 온도 또는 pH 각각에 의해 크로스 링크된 블록 폴리머를 포함할 수 있다. 일부 실시예들에서, 상기 하이드로겔 또는 기질은 생분해성이다.
- [0089] 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물은 제자리에서 중합가능한 겔(*in situ* polymerizable gel) (예를 들어, U.S. 특허 출원 공보 2002/0022676; Anseth *et al.*, *J. Control Release*, 78(1-3):199-209 (2002); 및 Wang *et al.*, *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003) 참조)을 포함한다.
- [0090] 일부 실시예들에서, 상기 폴리머들은 적어도 물, 완충 식염수, 또는 수성 알코올 용액 등 수용액 내 부분적으로 용해되며, 전하를 띄는 측쇄, 또는 이의 1가 이온염을 갖는다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측쇄를 갖는 폴리머들의 예는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 아크릴산 및 메타크릴산의 코폴리머, 폴리(비닐 아세테이트), 및 설포네이티드 폴리스티렌 등의 설포네이티드 폴리머이다. 아크릴산 또는 메타크릴산 및 비닐 에터 모노머 또는 폴리머의 반응에 의해 형성되는 산성 측쇄를 갖는 코폴리머가 또한 사용될 수 있다. 산성기들의 예는 카복실산기, 설포닉산기, 할로제네이티드 (바람직하게는 플루오리네이티드) 알코올기, 페놀릭 OH기, 및 산성 OH기이다.
- [0091] 특정 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물은 삼차원 골격 또는 스캐폴드, 예를 들어 인 비보 이식에 적합한 삼차원 골격 또는 스캐폴드 상(on)에 PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로, 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함한다.
- [0092] 그러한 조성물에 사용될 수 있는 스캐폴드의 예는 예를 들어, 부직포 매트, 다공성 폼, 또는 자기 조립형 펩타이드를 포함한다. 부직포 매트는 예를 들어, 글리콜산 및 락트산의 합성 흡수성 코폴리머(예를 들어, PGA/PLA)로 이루어진 섬유를 이용하여 형성될 수 있다 (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.). 예를 들어, 냉동-건조, 또는 동결건조 등의 공정으로 형성된 (예를 들어, U.S. Pat. No. 6,355,699 참조), 폴리(ϵ -카프로락톤)/폴리(클리콜산) (PCL/PGA) 코폴리머로 구성된 폼 또한 스캐폴드로 사용될 수 있다. 다른 스캐폴드는 예를 들어, 산화 셀룰로오스 또는 산화 재생 셀룰로오스를 포함할 수 있다.
- [0093] 또 다른 실시예에서, 상기 스캐폴드는 나노섬유 스캐폴드, 예를 들어 전기방사된 나노섬유 스캐폴드이거나, 또는 이를 포함할 수 있다. 더 특정한 실시예에서, 상기 나노섬유 스캐폴드는 폴리(L-락트산) (PLLA), 1형 콜라겐, 비닐리딘 플루오라이드 및 트리플루오로에틸렌의 코폴리머 (PVDF-TrFE), 폴리(-카프로락톤), 폴리(L-락티드-co- ϵ -카프로락톤) [P(LLA-CL)] (예를 들어, 75:25), 및/또는 폴리(3-하이드록시부티레이트-co-3-하이드록

시발레레이트) (PHBV) 및 1형 콜라겐의 코폴리머를 포함한다. 또 다른 더 특정한 실시예에서, 상기 스캐폴드는 태반 줄기 세포의 연골세포(chondrocytes)로의 분화를 촉진한다. 나노섬유 스캐폴드, 예를 들어, 전기방사 나노섬유 스캐폴드를 제조하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Xu *et al.*, *Tissue Engineering* 10(7):1160-1168 (2004); Xu *et al.*, *Biomaterials* 25:877-886 (2004); Meng *et al.*, *J. Biomaterials Sci., Polymer Edition* 18(1):81-94 (2007) 참고.

[0094] 여전히 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물은 PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 및 예를 들어, 모노-, 디-, 트리-, 알파-트리-, 베타-트리-, 및 테트라-칼슘 포스페이트, 수산화인회석, 플루오로인회석, 칼슘 설페이트, 칼슘 플루오라이드, 칼슘 옥사이드, 칼슘 카보네이트, 마그네슘 칼슘 포스페이트, BIOGLASS[®] 등의 생활성 유리 및 이들의 혼합물을 포함하는 생리학적으로 허용 가능한 세라믹 물질을 포함한다. 현재 상업적으로 이용가능한 다공성 생체 적합성 세라믹 물질들은 예를 들어, SURGIBONE[®] (CanMedica Corp., Canada), ENDOBON[®] (Merck Biomaterial France, France), CEROS[®] (Mathys, AG, Bettlach, Switzerland), 및 HEALOS[™] (DePuy, Inc., Raynham, MA) 및 VITOSS[®], RHAKOSS[™], 및 CORTOSS[®] (Orthovita, Malvern, Pa.) 등의 무기물을 함유하는 콜라겐 뼈 접목 제품들을 포함한다. 상기 골격은 천연 및/또는 합성 물질의 혼합물(mixture), 블렌드(blend) 또는 복합물(composite)일 수 있다.

[0095] 또 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물은 PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 및 펠트(felt)를 포함할 수 있으며, 이것은 예를 들어 PGA, PLA, PCL 코폴리머 또는 블렌드, 또는 히알루론산 등의 생체 흡수성 물질로 제조된 다섬유방사(multifilament yarn)으로 구성될 수 있다.

[0096] 특정 실시예에서, 본 발명에 따른 조성물은 PRP 또는 분리된 혈소판, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 및 폼 스캐폴드, 예를 들어 복합 구조(composite structures)로 만들어진 폼 스캐폴드를 포함한다. 그러한 폼 스캐폴드는 예를 들어, 수리, 교체 또는 보강될 신체의 특정 구조의 부분과 같은 유용한 형상으로 성형될 수 있다. 일부 실시예들에서, 상기 골격은 예를 들어 세포 부착을 강화하기 위해 PRP 또는 분리된 혈소판 및, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포를 포함하기 전에 앞서, 0.1M 아세트산으로 처리한 다음 폴리리신, PBS, 및/또는 콜라겐에서 배양된다. 기질의 외부 표면은 예를 들어, 세포의 부착 또는 성장, 그리고 원한다면 조직의 분화를 개선하기 위해, 상기 기질을 플라즈마 코팅함으로써, 또는 하나 이상의 단백질(예를 들어, 콜라겐, 엘라스틴 파이버, 그물섬유(reticular fibers)), 글리코단백질, 글리코사미노글리칸 (예를 들어, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴-4-설페이트, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마탄 설페이트, 케라틴 설페이트 등), 셀룰라 매트릭스, 및/또는 이에 제한되는 것은 아니나, 젤라틴, 알지네이트, 아가, 아가로오스, 및 식물성 검 등과 같은 다른 물질들을 추가함으로써 수정될 수 있다.

[0097] 일부 실시예들에서, 상기 스캐폴드는 이것을 비-혈전 형성성으로 만드는 물질들을 포함하거나, 또는 그 물질들로 처리된다. 이러한 처리 및 물질은 또한 내피 성장(endothelial growth), 이동(migration), 및 세포외 기질 침전(extracellular matrix deposition)을 촉진하고 유지할 수 있다. 이러한 물질 및 처리의 예는 이에 제한되는 것은 아니나, 라미닌 및 4형 콜라겐 등의 기초 막 단백질, EPTFE 등의 합성 물질, 및 PURSPAN[™] (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.) 등의 분절된 폴리우레탄우레아 실리콘 등의 천연 물질들을 포함한다. 상기 스캐폴드는 또한 헤파린 등의 항-트롬빈제를 포함할 수 있고; 상기 스캐폴드는 또는 태반 줄기 세포의 파종(seeding)에 앞서 표면 전하를 바꾸기 위해 처리될 수 있다(예를 들어, 플라즈마로 코팅하는 것).

[0098] 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물의 PRP는 자가 PRP이다. 일부 실시예들에서, 상기 조성물의 혈소판은 자가 혈소판이다. 일부 실시예들에서, 본 발명에 따른 조성물의 PRP는 동종 이계 PRP이다. 일부 실시예들에서, 상기 조성물의 혈소판은 동종 이계 혈소판이다. 본 발명은 혈소판-풍부 혈장과 결합된 태반 줄기 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 이것이 필요한 개체에 상기 조성물의 투입은 혈소판-풍부 혈장과 결합하지 않은 태반 줄기 세포의 투입과 비교하여, 주입 또는 이식의 위치에 상기 태반 줄기 세포의 연장된 국소화(localization)를 초래한다. 특정 실시예들에서, 상기 태반 줄기 세포는 인간의 것이다. 다른 실시예들에서, 상기 혈소판-풍부 혈장은 인간, 예를 들어 인류로부터 수득되거나 또는 유래된 것이다. 다른 실시예들에서, 상기 태반 줄기 세포 및 PRP는 모두 인간의 것이다.

[0099] 다양한 실시예들에서, 혈소판-풍부 혈장 대 태반 줄기 세포의 부피비는 10:1 내지 1:10일 수 있다.

[0100] 다른 실시예들에서, 혈소판-풍부 혈장과 결합된 태반 줄기 세포를 포함하는 상기 조성물의 이식

(transplantation)은 혈소판-풍부 혈장과 결합하지 않은 태반 줄기 세포의 이식과 비교하여, 상기 주입 또는 이식의 위치에서, 이식 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일 이상으로 상기 태반 줄기 세포의 국소화를 연장한다. 또 다른 더 특정한 실시예에서, 혈소판-풍부 혈장과 결합된 태반 줄기 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 주입 또는 이식의 위치에서, 이식 후 21일 이상으로 상기 태반 줄기 세포의 국소화를 연장한다. 특정한 실시예들에서, 혈소판-풍부 혈장과 결합된 태반 줄기 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 주입 또는 이식의 위치에서, 이식 후 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55주, 또는 1년 이상 또는 더 길게, 상기 태반 줄기 세포의 국소화를 연장한다.

[0101] 3. 약학 조성물

[0102] 또한 본 발명은 PRP 또는 여기에 개시된 바와 같이 수득된 분리된 혈소판, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 또한 PRP 또는 혈소판 및, 임의적으로 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 여기에 개시된 조합 조성물, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 여기에 개시된 상기 조성물의 약학 조성물을 개시한다.

[0103] 일 실시예에서, 예를 들어, 상기 PRP 또는 여기에 개시된 바와 같이 수득된 분리된 혈소판은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 주입 가능한 형태(예를 들어, 여기에 전체적으로 포함되는, WO 96/39101 참조)로 제제화될 수 있다. 일 실시예에서, 예를 들어, 여기에 개시된 바로 수득된 PRP 또는 분리된 혈소판을 포함하는 여기에 개시된 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 주입 가능한 형태(예를 들어, 여기에 전체적으로 포함되는, WO 96/39101 참조)로 제제화될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 여기에 개시된 상기 조성물은 예를 들어 U.S. 특허 Nos. 5,709,854; 5,516,532; 5,654,381에 개시된 중합 가능한 또는 크로스 링크하는 하이드로겔, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 이용하여 제제화될 수 있다.

[0104] 일 실시예에서, 여기에 개시된 조성물의 각각의 구성 성분, 예를 들어 PRP 또는 분리된 혈소판 및 줄기 세포는 사용에 앞서, 예를 들어 개체에 투여에 앞서, 여기에 개시된 조성물을 인 비보로 생성하기 위해 순차적으로 또는 공동으로 투여되기 위한 별도의 약학 조성물로서 유지될 수 있다. 각 구성 성분은 별도의 용기 예를 들어, 하나의 주머니(예를 들어, Baxter, Becton-Dickinson, Medcep, National Hospital Products, Terumo, 등으로부터 혈액 저장 주머니) 또는 별도의 주사기에 저장 및/또는 사용될 수 있으며, 이들은 단일 유형의 세포 또는 세포 집단을 함유한다. 특정 실시예에서, PRP 또는 분리된 혈소판은 하나의 주머니에 함유되며, 줄기 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포, 예를 들어 태반 관류액, 또는 태반 관류액으로부터의 태반 줄기 세포는 두 번째 주머니에 함유된다.

[0105] 특정 실시예에서, 상기 약학 조성물은 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 제제(agent)를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 분화를 유도하는 제제는 이에 제한되는 것은 아니나, Ca^{2+} , EGF, α -FGF, β -FGF, PDGF, 케라틴세포 성장 인자 (KGF), TGF- β , 시토카인 (e.g., IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , TFN), 레티노산, 트랜스페린, 호르몬 (예를 들어, 안드로겐, 에스트로겐, 인슐린, 프로락틴, 트리아이오도티록신, 하이드로코르티손, 텍사멘타손), 소듐 부티레이트, TPA, DMSO, NMF, DMF, 기질 요소 (예를 들어, 콜라겐, 라미닌, 헤파란 설페이트, MATRIGEL™), 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0106] 또 다른 실시예에서, 상기 약학 조성물은 세포 분화를 억제하는 하나 이상의 제제를 포함할 수 있다. 특정 실시예들에서, 분화를 억제하는 제제는 이에 제한되는 것은 아니나, 인간의 델타-1 및 인간의 서레이트-1(Serrate-1) 폴리펩티드 (Sakano *et al.*, U.S. 특허 No. 6,337,387 참조), 백혈구 억제 인자 (LIF), 줄기 세포 인자, 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

[0107] 여기에 개시되는 상기 약학 조성물은 예를 들어, 개체에 투여하기에 앞서 TNF- α 의 활성을 조절하는 조성물로 처리될 수 있다. 그러한 조성물은 예를 들어, 전체적으로 여기에 포함되는, U.S. 공개 공보 No. 2003/0235909에 상세하게 개시된다.

[0108] 4. 혈소판 및 혈소판-풍부 혈장을 이용하는 방법

[0109] 특정한 측면들에서, 여기에 개시되는 상기 PRP, 분리된 혈소판 및 조성물은 개인에 있어 질병, 장애 또는 건강 상태를 치료하는 데 이용된다. 예를 들어, 본 발명은 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물을 상처 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상처 치료를 촉진하는 방법을 제공한다. 또 다른 예에서, 본 발명은 조직 또는 기관 수복 또는 재생이 필요한 개체에 여기에 개시된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 조직 또는 기관 수복 또는 재생을 촉진하는 방법을 제공한다. 특정한 실시예에서, 본 발명은 뼈 수복 또는 재생이 필요한 개체에 여기에 개시되는 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 뼈 수복 또는 재생

의 방법을 제공한다.

- [0110] 일 실시예에서, 본 발명은 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물을 상처 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상처 치료를 촉진하는 방법을 제공한다. 그러한 방법은 이에 제한되는 것은 아니지만, 내피 상처, 피부 상처, 만성 상처, 급성 상처, 외부 상처, 내부 상처, 및 선천성 상처(예를 들어, 수포성 표피 박리증)를 포함하는 상처의 치료를 포함한다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 상처를 갖고 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0111] 다른 실시예들에서, 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물은 상처 감염, 예를 들어 외상 또는 외상성 상처의 파괴가 뒤따르는 상처 감염의 치료를 위해 개체에 투여된다. 그러한 상처 감염은 당업계에서 알려진 임의의 미생물, 예를 들어 병원성 유기체에 대한 공지된 저장소(reservoir)인, 인체 내에서 유래된, 또는 환경적 근원으로부터 유래된 상처를 감염시키는 미생물로부터 일 수 있다. 상처 내에서 이들의 성장이 여기에 개시되는 방법 및 조성물에 의해 저감되거나 또는 예방될 수 있는, 상기 미생물의 비제한적 예들은 *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, beta haemolytic streptococci, *Escherichia coli*, *Klebsiella* 및 *Pseudomonas* 중, 및 혐기성 박테리아들 중에서, 주로 심부 외상에서 가스 괴사의 원인인, *Clostridium welchii* 또는 *C. tartium* 이다.
- [0112] 다른 실시예들에서, 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물은 화상의 치료를 위해 투여되며, 상기 화상은 이에 제한되는 것은 아니나, 1도 화상, 2도 화상 (부분 두께 화상), 3도 화상 (전체 두께 화상), 화상 상처의 감염, 절단된(excised) 및 절단되지 않은(unexcised) 화상 상처의 감염, 이식된 상처의 감염, 기증 위치의 감염, 이전에 이식된 또는 치료된 화상 상처 또는 피부 이식 기증 위치로부터의 상피 손실, 및 화상 상처 고름 딱지증을 포함한다.
- [0113] 특정 실시예에서, 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물은 궤양(ulcer), 예를 들어 다리 궤양의 치료에 사용될 수 있다. 다양한 실시예들에서, 상기 다리 궤양은 예를 들어 정맥 다리 궤양(venous leg ulcer), 동맥 다리 궤양(arterial leg ulcer), 당뇨병성 다리 궤양(diabetic leg ulcer), 욕창 궤양(decubitus ulcer), 또는 부분층 피부 이식(split thickness skin grafted) 궤양 또는 상처일 수 있다. 이 문맥에서, "다리 궤양의 치료"는 적어도 다리 궤양의 한 측면을 개선하기 위해 유효한 양의 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물을 상기 다리 궤양에 접촉시키는 단계를 포함한다. 본 발명 명세서에서 사용된 바와 같이, "다리 궤양의 측면"은 궤양의 크기, 깊이 또는 영역, 염증 정도, 상피 및/또는 중배엽 조직의 내성장, 치료 과정과 관련된 궤양성 조직내 유전자 발현, 흉터의 질 및 정도 등과 같은 객관적으로 측정 가능한 파라미터들, 및 환자의 웰빙, 개선의 자각, 상기 궤양과 관련된 통증 또는 불편함의 완화 자각, 치료가 성공적이라는 환자의 자각 등과 같은 주관적으로 측정 가능한 파라미터들을 포함한다.
- [0114] 특정 실시예들에서, 본 발명은 적어도 다리 궤양의 한 측면을 개선하기 위해 유효한 양의 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 다리 궤양의 치료를 위한 방법을 개시한다. 정맥 울혈 궤양(venous stasis ulcers) 또는 정맥 부전 궤양(venous insufficiency ulcers)으로도 알려진 정맥 다리 궤양은 만성적 또는 악성(non-healing) 상처 유형으로서, 통상적으로 고령자들로, 약 7백만명이 겪고 있는, 미국에서 널리 유행하고 있다. 전세계적으로, 1-1.3%의 개체들이 정맥 다리 궤양을 겪고 있다. 모든 다리 궤양의 약 70%가 정맥 궤양이다. 정맥 다리 궤양은 종종 게이터 영역(gaiter region)으로 알려진 다리의 말단 3분의 1 지점, 및 통상적으로 다리의 안쪽에 위치한다. 상기 궤양은 통상적으로 감염되지 않는 한 통증이 없다. 정맥 다리 궤양은 통상적으로 표면 및 심부 정맥을 연결하는 판막(valves)이 적절히 기능하지 못하기 때문에 발생한다. 이러한 판막의 실패는 혈액이 심부 정맥으로부터 표면 정맥으로 되돌아오도록 한다. 중력의 효과와 함께 상기 부적절한 흐름이 붓기와 낮은 쪽 다리 조직의 손상의 진전을 야기한다.
- [0115] 정맥 다리 궤양이 있는 환자들은 종종 심부 정맥 혈전증, 다리 부상, 비만, 정맥염, 이전의 정맥 수술의 병력을 갖고 있으며, 장시간 서있는 것을 요구하는 생활습관을 갖는다. 다른 요인들이 정맥 다리 궤양의 만성에 기여할 수 있고, 그것들은 종종 동맥경화증에 의해 야기되는 빈약한 순환; 동맥경화증과 관련될 수 있고 또는 관련되지 않을 수 있는 응고 및 순환 장애; 당뇨병; 콩팥 (신장) 기능상실; (치료된 또는 치료되지 않은) 고혈압; (다리 또는 발의 붓기를 야기하는 액체로 발전된) 림프부종; 혈관염, 루푸스, 피부경화증 또는 다른 류마티스성 상태들 등의 염증성 질병; 높은 콜레스테롤, 심장 질환, 고혈압, 겸상 적혈구 빈혈증, 또는 장 질환 등의 건강 상태; (현재 또는 과거의) 흡연 경력; 한 자세로 너무 오래 누워있어 야기되는 압력; (정맥 질환에 대한 질병소질) 유전; 악성 (종양 또는 암성 질량); 감염; 및 특정 투약들을 포함한다.

- [0116] 따라서, 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 정맥 다리 궤양의 적어도 한 측면을 개선하기 위해 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 유효한 양을 상기 정맥 다리 궤양에 접촉시키는 단계를 포함하는, 정맥 다리 궤양을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 특정 실시예에서, 상기 방법은 추가적으로 상기 정맥 다리 궤양의 근본적인 원인(underlying cause)을 치료하는 것을 포함한다.
- [0117] 본 발명에서 제공되는 정맥 다리 궤양을 치료하는 방법은 정맥 다리 궤양을 치료하는 과정에 사용되는 하나 이상의 요법(therapies) 또는 치료들과 함께, 여기에 개시되는 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 치료적으로 유효한 양을 투여함으로써 상기 정맥 다리 궤양을 치료하는 단계를 더 포함한다. 상기 하나 이상의 추가적인 요법들은 여기에 개시되는 상기 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 투여에 앞서, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 사용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 상기 하나 이상의 추가적인 요법들은 부종(edema) 또는 붓기(swelling)을 최소화하기 위해 다리를 압박하는 것을 포함한다. 일부 실시예들에서, 압박 치료는 치료적 압박 스타킹, 다중층 압박 랩을 입는 것, 또는 ACE 밴드를 감싸는 것 또는 발가락이나 발에서부터 무릎 아래까지 드레싱하는 것을 포함한다.
- [0118] 동맥 다리 궤양은 하나 이상의 동맥이 다리 하부까지 혈액을 전달할 수 있는 능력이 부족하여 발생하며, 주로 흔히 동맥 경화증(atherosclerosis)에 의함이다. 동맥 궤양은 일반적으로 발, 특히 발 뒷꿈치 또는 발가락에서 발견되며, 상기 궤양의 경계는 "펀치 아웃(punched out)"된 것처럼 나타난다. 동맥 궤양은 종종 통증이 있다. 이 통증은 중력이 더 많은 혈액이 다리로 흐를 수 있도록 하기 때문에 바닥에 발을 낮추었을 때 완화된다. 동맥 궤양은 일반적으로 차가운 흰색 또는 푸른, 빛의 발과 관련된다.
- [0119] 동맥 다리 궤양의 치료는 표시되지 않는다면, 압박이 이미-빈약한 혈액 공급을 악화시키는 경향이 있고, 조직 제거(debridement)가 제한적이라는 점에서, 정맥 다리 궤양의 치료와 대조된다. 따라서, 또 다른 실시예에서 본 발명은 상기 동맥 다리 궤양, 예를 들어 동맥 경화증의 근본적인 원인을 치료하는 단계, 및 여기서 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 상기 동맥 다리 궤양의 적어도 한 측면을 개선하기에 충분한 양을 상기 동맥 다리 궤양에 접촉하는 단계를 포함하는, 동맥 다리 궤양을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 상기 치료 방법은 압박 요법을 포함하지 않는다.
- [0120] 당뇨병 발 궤양은 당뇨병으로부터의 합병증의 결과로 발생한다. 당뇨병 궤양은 통상적으로 작은 동맥 막힘 및 신경 손상의 조합에 의해 발생하며, 그들이 신경병증(neuropathy)과 압력에 의해 영향을 받은 다른 영역에 발생할 수 있을지라도, 발에서 가장 일반적이다. 당뇨병 궤양은 동맥 궤양과 유사한 특징을 갖지만, 발 뒤꿈치, 발 허리(balls of the feet), 발가락 끝, 발가락 사이 또는 침대 시트, 양말 또는 신발에 뼈 돌출부(bony prominences)가 문질러지는 임의의 곳과 같은 과 압력 지점에 위치하는 경향이 있다.
- [0121] 당뇨병 궤양의 치료는 일반적으로 압력이 없고; 추가적으로, 근본적인 당뇨병이 치료되거나 관리되어야 할지라도, 일반적으로 정맥 다리 궤양의 치료와 유사하다. 따라서, 또 다른 실시예에서, 본 발명은 근본적인 당뇨를 치료하는 단계, 및 여기서 제공되는 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 상기 당뇨 다리 궤양의 적어도 한 측면을 개선하기에 충분한 양을 상기 당뇨병 다리 궤양과 접촉시키는 단계를 포함하는, 당뇨병 다리 궤양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0122] 통상적으로 욕창(bedsore) 또는 압력 궤양(pressure ulcers)으로 불리는, 욕창 궤양(Decubitus ulcers)은 압력이 완화되면 몇 시간 안에 사라지는, 피부의 매우 온순한 분홍색부터 짙은 빨간색의 매우 깊은 상처까지 범위를 할 수 있다. 욕창 궤양은 장시간 침대에 있게 되는 환자들, 예를 들어 국소적인 압력의 영향으로 인해 피부 손상을 겪는 사지 마비 환자(quadriplegics) 및 마비 환자들(paraplegics)에 빈번하게 발생한다. 결과하는 압력 궤양은 피부(dermal) 침식과 표피(epidermis) 및 부속기(appendages)의 손실을 나타낸다. 욕창 궤양의 발전과 관련된 것으로 알려진 요인들은 고령, 부동(immobility), 영양 부족, 및 요실금(incontinence)을 포함한다. 제1단계 욕창 궤양은 손상되지 않은 피부의 비창백 홍반(nonblanchable erythema)을 나타낸다. 제2단계 욕창 궤양은 표면 상의 또는 부분 두께의 피부 손실을 나타낸다. 제3단계 욕창 궤양은 피하 손상과 함께 전체 두께의 피부 손실을 나타낸다. 상기 궤양은 아래 근막까지 확장되고, 깊은 분화구와 같이 나타난다. 마지막으로, 제4단계 욕창 궤양은 광범위한 파괴, 조직 괴사, 및 근본적인 근육, 뼈, 힘줄 또는 관절낭의 손상과 함께 완전한 두께의 피부 손실을 나타낸다. 따라서, 또 다른 실시예에서, 본 발명은 근본적인 당뇨병을 치료하는 단계, 및 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 상기 욕창 다리 궤양의 적어도 한 측면을 개선하기에 충분한 양을 상기 욕창 다리 궤양과 접촉하는 단계를 포함하는, 욕창 다리 궤양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0123] 또한, 본 발명은 다리 궤양을 치료하는 과정에 사용되는 하나 이상의 치료요법 또는 처리들과 함께 태반 줄기 세포 및 혈소판-풍부 혈장을 포함하는 조성물을 투여함으로써 다리 궤양을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 하

나 이상의 추가적인 요법들은 여기에 개시되는 상기 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 투여에 앞서, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 사용될 수 있다. 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물, 및 하나 이상의 추가적인 치료요법들은 여기에 제공된 상기 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물 단독, 또는 상기 하나 이상의 추가적인 치료요법 단독이 다리 궤양의 하나 이상의 측면을 측정 가능한 정도로 개선, 유지, 또는 악화를 저감하기에 불충분한 경우 사용될 수 있다.

[0124] 특정 실시예들에서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료요법들은 제한없이, 상처 치료제 (예를 들어, PDGF, REGRANEX[®])로 상기 다리 궤양의 치료; 항-염증 화합물의 투여; 통증 의약의 투여; 항생제의 투여; 항-혈소판 또는 항-응고 의약의 투여; 보철(prosthetic)의 적용; 드레싱 (예를 들어 습성 드레싱; 하이드로겔/하이드로콜로이드; 알지네이트 드레싱; 콜라겐 기반 상처 드레싱; 항균 드레싱; 복합 드레싱; 합성 피부 대응, 등)의 적용 등을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 추가적인 용법은 상기 다리 궤양을 풀로 접촉하는 단계를 포함한다. 상기 실시예들 중 임의의 것에 대해, 특정 실시예에서, 상기 다리 궤양은 정맥 다리 궤양, 욕창 궤양, 당뇨병성 궤양, 또는 동맥 다리 궤양이다.

[0125] 또 다른 특정 실시예에서, 상기 추가적인 요법은 통증 의약이다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 다리 궤양을 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물과 접촉하는 단계, 및 다리 궤양 통증을 저감 또는 제거하기 위해 통증을 투여하는 단계를 포함하는 다리 궤양을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 상기 통증약은 국소 통증약이다.

[0126] 또 다른 특정 실시예에서, 상기 추가적인 요법은 항-감염제이다. 일 실시예에서, 상기 항-감염제는 상기 다리 궤양 주변 및 아래의 건강한 조직에 세포독성이지 않은 것이며; 따라서, 아이오딘 및 표백제와 같은 화합물들은 선호되지 않는다. 따라서, 일 실시예에서, 상기 다리 궤양 치료는 상기 다리 궤양을 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물과 접촉하는 단계, 및 항-감염제를 투여하는 단계를 포함한다. 상기 항-감염제는 예를 들어 국소적으로(topically), 경구적으로(orally), 볼쪽으로(buccally), 정맥 내로(intravenously), 근육 내로(intramuscularly), 항문으로(anally) 등 임의의 경로로 투여될 수 있다. 특정 실시예에서, 상기 항-감염제는 항생제, 정균제, 항바이러스성 화합물, 바이러스 증식 억제제, 항진균 화합물, 정진균제, 또는 항균성 화합물이다. 또 다른 특정 실시예에서, 상기 항-감염제는 아이오닉 실버(ionic silver)이다. 더 특정 실시예에서, 상기 아이오닉 실버는 하이드로겔 내에서 함유된다. 특정 실시예들에서, 상기 다리 궤양은 정맥 다리 궤양, 동맥 다리 궤양, 욕창 궤양, 또는 당뇨병성 궤양이다.

[0127] 여기에 개시된 치료 방법들의 또 다른 특정 실시예들에서, 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물은 정형외과학 장애들을 치료하는 데 사용되며, 이들은 이에 제한되는 것은 아니나, 뼈 장애, 디스크 탈출 및 퇴행성 디스크 질병을 포함한다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 뼈 장애, 디스크 탈출, 또는 퇴행성 디스크 질병을 갖고 있는 개인을 치료하는 방법으로, 여기에 개시된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물을 치료적으로 유효한 양을 상기 개인에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0128] 특정 측면에서, 본 발명은 대상(subject)에 있는 뼈 장애를 치료하는 방법으로서, 이것이 필요한 대상에 상기 대상의 뼈 장애를 치료하는 데 유효한, 여기에 개시된 이식 가능하거나 주입 가능한 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정 실시예들에서, 상기 뼈 장애는 압, 뼈 골절, 또는 예를 들어 융합(fusion)이 필요한 척추와 관련된 골 융해성 병변이다. 특정 실시예들에서, 상기 골 융해성 병변은 다발성 골수종, 골암, 또는 전이암과 관련된다. 특정 실시예들에서, 이식 가능한 조성물은 상기 대상에 투여된다. 특정 실시예들에서, 이식 가능한 조성물은 예를 들어, 상기 뼈 장애의 위치에, 외과적으로 이식된다. 특정 실시예들에서, 주입 가능한 조성물은 상기 대상에 투여된다. 특정 실시예들에서, 주입 가능한 조성물은 상기 뼈 장애의 영역에 외과적으로 투여된다.

[0129] 특히, 본 발명은 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 투여를 포함하는, 탈출된 디스크 및 퇴행성 디스크 질병의 치료를 위한 방법을 개시한다. 일부 실시예들에서, 상기 퇴행성 디스크 질병은 인접한 추골(vertebrate) 사이의 정상적인 "디스크 공간"을 좁혀짐에 따라 상기 척추(spine)의 x-ray 실험 또는 MRI 스캐닝 상에서 특징화된다.

[0130] 의학적으로 척추증(spondylosis)으로 언급되는 디스크 퇴행은 신체 연골의 수분 및 단백질 함량이 변화하는 연령에 발생할 수 있다. 이 변화는 더 약하고(weaker), 더 연약하고 얇은 연골을 초래한다. 상기 추골(후관절(facet joints))을 쌓는 디스크와 관절은 모두 부분적으로 연골로 구성되기 때문에, 이 영역들은 퇴행성 변화의 대상이고, 상기 디스크 조직이 탈출할 수 있게 된다. 상기 추골 사이의 디스크의 점진적인 악화는 퇴행성 디스크 질병으로 언급된다. 상기 디스크의 퇴행은 영향받은 지역에 국소적인 통증, 예를 들어 신경뿌리병

(radiculopathy), 즉 상기 추골 사이의 디스크에 대한 손상으로 야기된 신경 자극을 야기할 수 있다. 특히, 약한 외곽 고리는 디스크 돌출 및 탈출을 초래한다. 그 결과로, 상기 디스크의 중심 연질 부는 디스크 외곽 고리를 통해 파열될 수 있고 그들이 뼈 척주(bony spinal column)를 나올 때 상기 척수 또는 이것의 신경을 접촉(abut)할 수 있다.

[0131] 임의 단계의 척추가 디스크 퇴행에 의해 영향받을 수 있다. 따라서, 일부 실시예들에서, 여기에 제공된 방법에 의해 치료 가능한 상기 퇴행성 디스크 질병은 팔에서 고통스러운 타는 느낌 또는 쭈시는 느낌을 종종 동반하는, 경추 디스크 질병(cervical disc disease), 즉 목의 척추에 영향 주는 디스크 퇴행이다. 일부 실시예들, 상기 퇴행성 디스크 질병은 흉부 디스크 질병, 즉 중간 등(mid-back)에 영향을 주는 디스크 퇴행이다. 일부 실시예들에서, 상기 퇴행성 디스크 질병은 요통(lumbago), 즉 허리 척추에 영향을 주는 디스크 퇴행이다.

[0132] 특정 실시예들에서, 대상에 있어 퇴행성 디스크 질병을 치료하는 상기 방법은 상기 대상에 경추 또는 요추의 신경 뿌리병을 치료하기에 충분한, 여기에 개시된 이식 가능한 또는 주입 가능한 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 이것이 필요한 대상에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예들에서, 상기 요추 신경 뿌리병은 방광 및/또는 장의 실금(incontinence)을 동반한다. 일부 실시예들에서, 대상에 있어 퇴행성 디스크 질병을 치료하는 상기 방법은 상기 대상에 좌골신경(sciatic)의 통증을 완화하기에 충분한, 여기에 개시된 이식 가능한 또는 주입 가능한 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 이것이 필요한 대상에 투여하는 단계를 포함한다.

[0133] 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물로 개체의 디스크 퇴행을 치료하는 방법들의 일부 실시예들에서, 상기 개체의 디스크 퇴행은 C1 및 C2 사이; C2 및 C3사이; C3 및 C4사이; C4 및 C5사이; C5 및 C6사이; C6 및 C7사이; C7 및 T1사이; T1 및 T2사이; T2 및 T3사이; T3 및 T4사이; T4 및 T5사이; T5 및 T6사이; T6 및 T7사이; T7 및 T8사이; T8 및 T9사이; T9 및 T10사이; T10 및 T11사이; T11 및 T12사이; T12 및 L1사이; L1 및 L2사이; L2 및 L3사이; L3 및 L4사이; 또는 L4 및 L5 사이의 척추원반에서 발생한다.

[0134] 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물로 개체의 디스크 퇴행을 치료하는 방법들의 일부 실시예들에서, 상기 디스크 탈출은 C1 및 C2사이; C2 및 C3사이; C3 및 C4사이; C4 및 C5사이; C5 및 C6사이; C6 및 C7사이; C7 및 T1사이; T1 및 T2사이; T2 및 T3사이; T3 및 T4사이; T4 및 T5사이; T5 및 T6사이; T6 및 T7사이; T7 및 T8사이; T8 및 T9사이; T9 및 T10사이; T10 및 T11사이; T11 및 T12사이; T12 및 L1사이; L1 및 L2사이; L2 및 L3사이; L3 및 L4사이; 또는 L4 및 L5 사이의 척추원반에서 발생한다.

[0135] 후관절(facet joints)의 퇴행성 관절염(골관절염)은 또한 평 x-ray 시험으로 감지될 수 있는 국소적 요통의 원인이다. 후연골(facet cartilage)의 마모(wear) 및 인접하는 관절의 뼈 변화는 퇴행성 후관절 질병(degenerative facet joint disease) 또는 척추의 골관절염(osteoarthritis of the spine)으로 언급된다.

[0136] 여기에 개시된 퇴행성(degerative) 디스크 질병을 치료하는 방법은 퇴행성(degerative) 디스크 질병을 치료하는 과정에 사용된 하나 이상의 치료 요법 또는 처리들과 함께, 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 투여함으로써 퇴행성(degerative) 디스크 질병을 치료하는 단계를 포함한다. 상기 하나 이상의 추가적인 치료요법은 여기에 제공된 PRP, 분리된 혈소판 또는 조성물의 투여에 앞서, 동시에, 또는 후에 이용될 수 있다. 일부 실시예들에서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료요법은 통증 및 근육 경련을 완화하기 위한 약의 투여, 척수 주위의 코티존 주입(경막 외 주입), 물리 치료(열, 마사지, 초음파, 전기 자극), 및 휴식(침대 휴식에 제한이 아닌, 재-부상 예방)를 포함한다.

[0137] 일부 실시예들에서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료요법은 예를 들어, 상기 대상이 무자비한 통증, 기능의 심각한 손상, 또는 (척수 자극을 나타낼 수 있는) 실금을 나타내는 경우, 수술 중재(operative intervention)를 포함한다. 일부 실시예들에서, 상기 수술 중재는 (상기 척수 주변의 척추 뼈에 작은 구멍을 만드는) 척추뼈고리 절개술(laminotomy), (상기 신경 조직에 인접한 뼈 벽의 제거인) 고리관절제술(laminectomy), 피부를 통한 바늘 기술 (경피 척추원반절제술, percutaneous discectomy), 디스크-용해술 (화학핵소체 용해술), 및 기타로 상기 탈출된 디스크의 제거를 포함한다.

[0138] **등가물(Equivalents)**

[0139] 여기에 개시된 상기 조성물 및 방법은 여기에 개시된 특정 실시예들의 범위에 제한되지 않는다. 실제로, 개시된 것들에 추가로 상기 조성물 및 방법의 다양한 변형들이 선행하는 설명들과 수반하는 도면들로부터 당업계 통상의 기술자들에게 자명해질 것이다. 그러한 변형들은 첨부된 청구항의 범위 내가 되도록 의도된다.

[0140] 다양한 간행물들, 특허 및 특허 출원서들이 여기에 인용되며, 상기 개시들은 그들 전체적으로 참조에 의해 포함

된다.