(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 1/14
C07K 14/75

(45) 공고일자 2004년04월21일
(11) 등록번호 10-0411438
(24) 등록일자 2003년12월03일

(21) 출원번호	10-1996-0704288	(65) 공개번호	10-1997-0700689
(22) 출원일자	1996년08월07일	(43) 공개일자	1997년02월12일
번역문제출일자	1996년08월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/015171	(87) 국제공개번호	WO 1996/17871
(86) 국제출원일자	1995년12월07일	(87) 국제공개일자	1996년06월13일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 그루지야 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 리투아니아 라트비아 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로베니아 슬로바키아 트리니다드토바고 AP ARIPO특허 : 케냐 말라위 수단 EA 유라시아특허 : 아르메니아 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 포르투칼 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		

(30) 우선권주장 08/351,010 1994년12월07일 미국(US)

(73) 특허권자 플라스마실 코포레이션
미국 캘리포니아주 94133 샌프란시스코 몽고메리 스트리트 1360 수트 7
(72) 발명자 안테너빅, 리차드, 디.
미국 93446 캘리포니아주 파소 로블스 챠든네이 플레이스 6830
도리안, 란델
미국 94563 캘리포니아주 오린다 오크 로드 15
(74) 대리인 장수길

심사관 : 김재현

(54) 혈장농축물및조직봉합제조성물

명세서

<1> 발명의 배경

기술분야

<2> 본 발명은 조직 봉합, 혼합물 중의 고분자량 성분의 신속한 분리, 혈장의 신속한 분리, 및 혼합물 중의 입자 성분의 신속한 분리를 위한, 농축된 혈장 및 조직 봉합제의 조성물, 제조 방법 및 장치에 관한 것이다. 본 발명은 특히 자기 조직(autologous)인 조직 봉합제의 제조 및 용도로 사용할 수 있다.

배경기술

<3> **피브린 글루 및 봉합제**

<4> 외과 수술용으로 적합한 조직 접착제에 대한 필요성을 만족시키기 위하여 여러가지 물질이 시판되었다. 시아노아크릴레이트와 같은 완전 합성 물질이 개발되었으나 불만족스러운 것으로 밝혀졌다. 혈액 성분으로부터 제조된 천연 피브린 글루(glues) 및 봉합제가 본 기술 개발 초기에 인식되었다. 소의 트롬빈에 의해 활성화된 사람의 피브리노겐으로 구성된 외과용 "피브린 봉합제" (통상적으로 "피브린 글루"로 칭함)가 유럽에서는 흔히 사용되고 있다. 상기와 같은 피브린 봉합제는 여러 경우에 있어서 합성 접착제 또는 전통적인 외과술보다 우수한 것으로 밝혀졌다. 또한 이들은 수혈의 필요성을 감소시킨다. 피브린 봉합제에 대한 학술적 및 외과적 견해는 매우 호의적이다. 최근의 평가는 다음과 같다:

<5> 피브린 봉합제는 지금까지 가장 성공적인 조직 접착제이다. 이들은 시아노아크릴레이트 및 해양 접착제와 같은 접착제보다 생체 적합성, 생분해성 및 지혈작용에 있어서 여러가지 장점을 갖는다. 유럽에는 수개의 상업적 제품이 있지만 혼주(混洲) 혈장 혈액 제품에 대한 규제 강화로 인하여 미국내에는 없다(Sierra, 1993; 하기 참조).

<6> 최근, 통상적으로 저온 침전법에 의해 사람의 피브리노겐, 피브로넥틴 및 인자 XIII의 농축물을 분리하고, 사용 직전에 소의 트롬빈 (또는 종종 사람의 트롬빈)과 합하여 피브린 봉합제를 제조한다. 트롬빈은 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는데, 피브린은 신속하게 겔화되어 일시적인 지혈 플러그를 형성하며, 이후 지혈 플러그는 인자 XIII에 의해 안정화된다. 피브로넥틴은 혈병 및 조직을 재집단화시키는

세포에 접착성을 제공한다. 피브린 봉합제의 가장 통상적인 적용 방법은 혼주한 사람의 혈액으로부터 농축된 피브리노겐을 소의 트롬빈 및 칼슘과 사용 직전에 혼합하는 것이다.

<7> 피브린 봉합제는 미국에서는 상업적으로 입수할 수 없지만 유럽에서는 입수할 수 있다 (TISSEEL®, TISSUCOL®/Immuno; BERIPLAST®/Behring). 수많은 문헌에 이의 용도에 대해 개시되어 있다.

<8> 미국내에서 피브린 봉합제의 용도는 임상외 FDA 통제내 제제로 한정된다. 미국내에서 이들 제품 인가에 대한 FDA 규제 이유는

<9> ● 혼주한 사람 혈액[1]으로부터의 바이러스 전이 (예를들면, HIV, 간염) 및

<10> ● 소의 트롬빈[2]에 대한 면역 반응, 예를들면 트롬빈과 인자 V 억제제 또는 이물 반응[3].

<11> 이러한 FDA의 우려는 외과의들의 관심이 크고 문헌의 매우 호의적인 비교 연구에도 불구하고 FDA가 어떠한 피브린 봉합제 제품도 승인하지 않는 정도로 심각하다. 이러한 상황으로 인하여 실용적인 방법으로 TISSUCOL 시스템중 피브리노겐 함유 성분의 자기 조직의 대응체를 분리하는 방법을 제공하는데 관심을 갖게 되었다. 이들 노력은 하기 인용된 문헌에 개시되어 있다. 하기 톰슨(Thompson[4])의 문헌에는 즉석의 자기 조직의 피브리노겐의 수치와 크게 연관되어 있음이 나타나있다:

<12> 피브린 글루는 피브리노겐과 트롬빈의 2개의 별개의 용액으로 이루어져 있다. 함께 혼합시, 이들 제제는 혈병 캐스케이드의 최종 단계를 모방하여 피브린 혈병을 형성한다. 피브린 글루는 유럽에서는 입수가능하나 미국에서는 상업적으로 입수할 수 없으므로, 연구원들은 그들 자신의 피브린 글루를 임시 미봉책으로 제조하였다. 피브리노겐은 혼주된, 단독 공여자, 및 자기 조직의 혈액 공여자로부터 수득할 수 있으며 통상적으로 저온 침전법등의 방법으로 분리한다.… 가장 안전한 제제는 환자 자신의 혈액을 사용하여 피브린 글루를 제조하는 것이다.… 자기 조직의 혈액을 사용하면 질병 감염의 위험이 최소가 되지만, 선발 공정에서와 같은 관련 용도를 필요로 한다. 보통 외상 또는 응급 외과 수술에서는 자기 조직의 혈액을 사용하는 것이 불가능하다.

<13> 지덴탑(Siedentop[3])은 피브린 글루의 피브리노겐 공급 성분으로서 상기 물질을 사용하는 것이 제안된 것과 관련하여 혈장으로부터 피브리노겐을 침전시키는 수많은 방법을 제시하고 있다. 4가지 방법이 제안되어 있다: 에탄올을 사용한 침전법, 비분획화 혈장의 사용, 저온 침전법, 및 황산암모늄을 사용한 침전법. 엡스타인(Epstein[6])은 폴리에틸렌 글리콜 침전법을 사용하여 수득한 자기 조직의 혈장으로부터 피브리노겐 제제를 사용하는 것을 제안하였다. 에탄올 침전법을 기본으로하는 비교적 복잡한 시스템을 사용하는 자기 조직의 조직 접착제 제조 시스템이 바이스-포흐(Weis-Fogh[7])에 의해 개시되어 있다. 이들 방법중 어느 것도 지금까지 명백히 탁월한 자기 조직의 봉합제를 제조하지 못했기 때문에, 혈장 봉합제[8], 에탄올 침전법[9] 및 신속한 동결 침전법[10]에 대해 지난 5년간 연구를 계속하여 왔다. 선행 특허에는 최근의 섹션: Autologous Precipitate Sealants and Autologous Plasma Sealants에 개시되어 있다.

<14> 이들 방법중 어느 것도 외과 수술중에 신속하게 제조할 수 있는 접착제로서 자기 조직의 혈장 분획을 편리하게 사용할 수 있도록하는데 용이하게 적용시킬 수 없다. 상기 목적을 위한 피브리노겐 함유 분획의 제조용으로 제시된 상기 방법은 모두 시간이 너무 많이 소요되며 외과 수술중에 수행할 수 있을 정도로 짧은 시간내에 완성하기에는 너무 복잡하다. 또한, 동결 침전법과 같은 일부 방법에서는 냉장 원심분리기와 같은 특수 장비를 필요로한다. 선행 기술 방법으로 선행 조성물을 제조하고자 할 경우, 이는 즉시 환자와 매치되는 샘플의 확인 및 검색을 위한 추가의 공정, 및 추가의 의과 진료를 위한 시간을 정해야하는, 환자에게 불편한 점외에, 에러가 수반되는 문제점을 필수적으로 갖게된다. 물론, 상기 방법의 실시는 외과 수술이 응급 상황에서 수행되는 경우 불가능하다.

<15> 외과용 접착제에 대해서 일반적으로, 또한 특히 피브린 글루에 대해서 수개의 유용한 논문에 개시되어 있다 (참조: Sierra, D.H. "Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications. "J. Biomater Appl 7(4 1993):309-52; Wiseman, Davis M., Davis T. Rovee, and Oscar M. Alverez. "Wound Dressings: Design and Use." In Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects, ed. I. Kelman Cohen, Robert F. Diegelmann, and William J. Lindblad. 562-580. 1st ed., Vol. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992). 외과의에 의해 사용되는 장치에 대한 논문에는 지혈제 및 접착제 둘다의 배경에 있어서 피브린 글루가 기술되어 있다 (Edlich, Richard F., George T. Rodeheaver, 및 John G. Thacker. "Surgical Devices in Wound Healing Management." In Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects, ed. I. Kelman Cohen, Robert F. Diegelmann, and William J. Lindblad. 581-600. 1st ed., Vol. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992). 혈액 응고에 있어서 피브린과 피브리노겐의 역할에 대한 논문에 또한 개시되어 있다 (참조: Jackson, C.M. and Y. Nemerson. "Blood coagulation." Annu Rev Biochem 49 (811 1980): 765-811). 역연대순으로, 다음과 같은 기타 논문이 있다:

(1) Lerner, R. 및 N.S. Binur. "Current status of surgical adhesives." J Surg Res 48 (2 1990): 165-81.

(2) Gibble, J. W. 및 P. M. Ness, "Fibrin glue: the perfect operative sealant?", Transfusion 30 (8 1990): 741-7.

(3) Thompson, D. F., N. A. Letassy, 및 G. D. Thompson, "Fibrin glue: a review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat.". Drug Intell Clin Pharm 22(12 1988): 946-52

<18> **생물학적 침전물 봉합제**

<19> 혈액 유래의 글루 또는 봉합제 제조를 위한 대다수의 종래 방법은 혼주 혈장으로부터 침전된(통상적으로는 저온 침전된) 피브리노겐을 사용한다(1972[11]에 처음으로 개시된 방법). 대부분의 생물학적 봉합제 특허들은 저온 침전법의 개선에 관한 것이다. 대부분은 사용전에 동결 건조 단계를 거친다. 혈장에 관해서는 몇가지 접근이 있으나, 농축된 혈장으로부터 산출된 조성물에 관한 것은 언급된 바 없다.

<20> 저온 침전법으로부터 제조된 조성물은 Immuno AG[12]에게 특허되었다. 기본적 방법은 이미 공개되어 있으므로, 조성물 청구항들을 정확하게 기술하였다:

<21> 예시 청구항: 1. 피브리노겐, 알부민, XIII 인자, 저온 불용성 글로불린 및 플라스미노겐-활성화제 억제제 또는 플라스민 억제제를 포함하며, 여기서, 피브리노겐은 33 중량% 이상으로 존재하며, 피브리노겐에 대한 XIII 인자의 비는 피브리노겐 1 g 당 XIII 인자의 단위로 나타내어 80 이상이고; 피브리노겐 및 알부민은 33 내지 90 : 5 내지 40 으로 존재하는, 포유동물 단백질 유래의 동결 건조된 조직 접착제.

<22> 다수의 발명들이 초기의 저온 침전법을 개선시켜 왔다. 저온 침전법의 한 변형은 혈액 응고 장애를 갖는 환자용으로 우수한 물질을 제조하는 것이다[13]. 스트로에트만(Stroetmann)은 피브리노겐, 트롬빈 및 프로테아제 억제제를 분말로서 투여하기 위하여 동결 건조 형태로 혼합시켜 문제를 극복하였다[14]. 베링(Behring)은 (가용성이 불충분한) 저온 침전물의 용해성을 개선시키는 방법을 알아내었다[15]. 프랑스 과학자들은 복식 냉각(double cold) 에탄올 침전법을 사용하여 종래의 저온 침전법을 개선시켜왔다[16]. 엡스타인(Epstein)은 폴리에틸렌 글리콜을 사용하는 침전법에 대하여 특허 출원하였다(분할 출원만 허여되었다)[17]. 크라이오라이프(Cryolife)는 광범위한 예시 청구항이 있는 특허를 만들었으나(주에서 인용됨), 모든 청구항은 침전 단계의 사용에 한정된다.

<23> 시에라(Sierra) 그룹은 피브리노겐에 첨가된 콜라겐을 사용한 조성물을 특허받았다. 요지는 콜라겐이 봉합제의 기계적 특성을 개선시키는 것이다[19]. 관련된 접근으로는 겔화전에 용액을 보다 점성을 띄게 하기 위한 히알우론산의 첨가(특허 출원)[20] 및 기계적 강도를 위한 실크 피브로인의 첨가[21]가 있다.

<24> 개시된 국제 특허 출원은 백스터(Baxter)가 침전법으로 인한 문제를 해결하기 위하여 피브리노겐 친화 크로마토그래피를 사용함을 나타낸다[22]. 개시된 유럽 특허 출원은 스퀴브(Squibb) 과학자들이 트롬빈의 필요를 없애는 방법을 발전시켰음을 나타낸다[23]. 이들은 부동화된 뱀-독물(snake-venom)을 사용하는 컬럼에 피브리노겐을 통과시키므로서 제조된 피브린을 사용하며; 카오트로픽제(chaotropic agents)가 겔화를 방지한다. 이 연구에 따르면, "피브린 I 단량체는 피브리노겐과는 대조적으로 트롬빈 또는 XIII 인자를 사용하지 않으면서 피브린 중합체로 용이하게 전환될 수 있으므로 바람직하다". 이 방법은 혈액으로부터 60 내지 90% 피브린 단량체를 산출한다. 이는 칼슘 및 pH 변화에 의해 활성화된다.

<25> 대부분의 생물학적 특허들은 조직 봉합제의 제조에서 침전 단계를 산정한다.

<26> **자기 조직의 침전물 봉합제**

<27> 상기한 바와 같이, 자기 조직의 혈액 제품이 안전 및 생체적합성의 이유로 우수함이 광범위하게 알려져 있다. 콜럼비아 대학은 자기 조직의 피브린 글루의 용도에 대하여 특허를 받았으나[24], 청구항들은 저온 침전물에 한정된다. 유럽 특허 출원은 유사한 청구항들을 만들었으나[25], 청구항들은 역시 저온 침전물에 한정된다.

<28> **자기 조직의 혈장 봉합제**

<29> 알터바움(Alterbaum)은 소량의 환자의 혈장을 사용하여 조직 접착제를 제조하는 것으로 특허를 받았으나[26], 혈장은 농축되지 않고, 청구항들은 혈장의 단리를 위한 평평한 팩(pack) 원심 분리기의 용도에 한정된다.

<30> 1. (a) 혈액 또는 혈장을 실질적으로 평평한 팩킷(packet)으로 전달하고; (b) 혈액 또는 혈장을 함유하고 있는 이 팩킷을 실질적으로 원주형인 삽입 고정 장치 어셈블리의 후미에 고정하고; (c) 이 원주

형 삽입 고정 장치 어셈블리를 보완적인 원주형을 갖는 원심 분리 컵내에 삽입시켜 삽입 고정 장치 어셈블리가 상기 원심 분리 컵내에서 꼭 맞게 고정되도록 하고; (d) 상기 원심 분리 컵에 고정된 상기 삽입 고정 장치 어셈블리내에 고정된 상기 팩킷내에 함유된 혈액 또는 혈장을 원심 분리하고; (e) 상기 분리된 성분의 하나로부터 피브린 글루를 형성시키는 단계를 포함하는, 환자의 혈액을 회전기(rotor)에 선회축으로 장착된 원주형 컵이 있는 원심 분리기로 분리시켜 혈장을 수득하고, 혈장을 원심 분리기로 분리시켜 농축된 피브리노겐을 제조하는, 피브린 글루의 자기 조직의 제조에서 사용하기 위한 방법.

<31> 혈장을 농축시키는 것을 언급하거나 제안한 청구항은 없으나, 본 발명에 가장 유사한 것으로 나타난 특허(Dennis Galanakis, SUNY Stony Brook)는 비농축된 혈장 접착제를 포함한다[27]:

<32> 1. (a) 포유 동물로부터 혈액의 샘플을 취하고; (b) 상기 (a) 단계에서 취한 혈액으로부터 혈장 전부를 거의 즉시 분리하며; (c) 상기 (b) 단계로부터 생성된 혈장 전부를, 치료 부위에서 피브린 응고를 제공하기 위한 용량 및 비율로 생리학적으로 허용가능한 용액내에서 트롬빈과 접촉시키는 단계를 포함하는, 지혈을 수행하기 위한 자기 조직의 포유 동물 혈장 피브린을 사용한 치료 방법.

<33> **도포기**

<34> 피브린 접착제의 도포는, 겔화가 매우 신속하게 될 수 있으므로, 조절된 조건하에 2개의 성분을 혼합시키는 것을 필요로 한다. 초창기의 도포기 특허들은 Immuno AG에 속한 것이었다. 주요 청구항들은 소용량의 보다 농축된 트롬빈을 사용함으로써 피브리노겐 성분의 희석을 제한하기 위하여 상이한 시린지 직경 및 시린지 도포기/혼합기를 겔로부터 청결하게 유지하기 위한 의학적 기체의 사용을 포함한다[29]. 갈라나키스(Galanakis)는 2 개의 액체가 내부적으로는 혼합되지 않으나, 도포점에 대하여 모든 방향으로 평행하게 주행하는 튜브로부터 나란히 도포되는 도포법을 기술하였다[27]. 매우 유사한 청구항들이 마이크로메딕스(Micromedics)사에 의해 먼저 청구되었다[30]. 코러스 메디칼(Corus Medical)사는 가압 기체에 의해 추진되는 에어로졸 장치를 보유하고 있다[31]. 크라이오라이프의 접근법은 트롬빈의 pH 억제에 의해 단일 성분 피브린 글루 내에서의 겔화를 방지하는 것이다[32]. 고든 엡스타인(Gordon Epstein)은 도포 전에 표면을 건조시키기 위한 제3 흡인 팁의 용도에 대하여 특허받았다.

<35> **혈장 분리기**

<36> 헤모네틱스(Haemonetics)사의 "보울(bowl)" 기술은 하기 개시된 본 발명의 방법과는 상이한 방법에 의해 연속적으로 혈장을 분리시킨다. 다수의 특허들은 원심 분리 침강법[34] 또는 적혈구 배리어(barrier)[35]를 사용하는 혈액으로부터의 혈소판의 단리에 대한 것이나, 소결된(다공성) 플라스틱을 포함하는 본 명세서에 기재된 것, 또는 적혈구는 배리어를 통과하고, 혈소판이 풍부한 혈장은 뒤에 잔류하는 것과 유사한 접근법에 대해서는 청구된 바 없다.

<37> **덱스트란**

<38> 파마시아사(Pharmacia)는 덱스트라노머[36] 및 상처 치료에서의 그들의 용도[37]에 관한 기본적 특허를 갖고 있다. 흥미롭게도, 물과 전해질의 차등적인 흡수에 의한 상처 부근의 단백질(피브리노겐 포함)의 농축은 이 기술의 잇점인 것으로 나타나지만, 청구항들은 덱스트라노머 비드를 상처에 도포하는 방법에 제한된다.

<39> **기타 관련 특허**

<40> 피브린 봉합제는 연골을 치료하고[38], 안구 외과술에 도움을 주고[39], "조직 용접[40]"을 위한 열 용융된 콜라겐을 사용하는 조성물중의 성분으로서 청구되어 왔다. 그밖의 접근법에서는, 파열된 상처의 출혈을 정지시키기 위한 생분해성 섬유를 피복시키기 위하여 피브리노겐/트롬빈 분말을 사용하거나[41], 분말화된 피브린 봉합제를 사용한 매트 또는 콜라겐 스폰지로서 사용하여 왔다[42]. 신경 치료를 개선시키기 위한 피브린 봉합제에 대한 콜라게나제의 첨가는 웰링(Wehling)에 의하여 특허되었다[43]. 파마시아사는 접착을 방지하기 위한 히알우론산의 용도를 특허받았다[44].

<41> **현재 미국에서의 피브린 봉합제 사용의 요약**

<42> 상처는 자연적으로 치료되지만, 의학은 상처 치료 과정을 개선시키고 신속하게 하는 것을 추구하고 있다. 인체의 혈액 응고 및 조직 치료 메카니즘은 혈액 단백질(예: 피브리노겐)로부터 특정화된 치료 세포(섬유아세포)로 진행하는 복잡한 캐스캐이드이다. 봉합용 실, 외과용 섬유 또는 외과용 접착제들은 손상된 조직과 함께 고정되어 치료가 진행될 수 있다. 소의 트롬빈에 의해 활성화된 사람의 피브리노겐으로 이루어진 종종 "피브린 글루"로 불리우는 외과용 "피브린 봉합제"는 유럽에서 광범위하게 사용되고 있다. 이와 같은 피브린 봉합제는 많은 상황하에서 합성 접착제 또는 전통적 외과술 보다 우수한 것으로 나타났다. 또한, 이들은 수혈의 필요를 감소시킨다. 피브린 봉합제에 대한 학술적인 외과적 의견은 매우 우호적이다(상기 인용된 참고 문헌을 참조).

<43> 근래 관행에서는, 통상적으로 저온 침전법에 의하여 사람의 피브리노겐, 피브로넥틴 및 XIII 인자의 농축물을 단리시키고, 사용 직전에 소의 트롬빈과 합하여 피브린 봉합제를 제조한다. 트롬빈은 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는데, 피브린은 신속하게 겔화되어 일시적인 지혈 플러그를 형성한다. 피브린 봉합제의 가장 통상적인 적용 방법은 혼주한 인간 혈액으로부터 농축된 피브리노겐을 소의 트롬빈 및 칼슘과 사용 직전에 혼합시키는 것이다.

<44> 피브린 봉합제는 미국에서는 상업적으로 입수할 수 없지만 유럽에서는 입수할 수 있다. FDA는 혼주한 사람의 혈액으로부터 바이러스 전이(예: HIV, 간염)에 대한 잠재성 및 면역학적 반응에 대한 잠재성으로 인하여 미국에서 이러한 제품을 승인하는 것을 꺼려하고 있다. 이와 같은 FDA의 우려는 외과의들의

관심이 크고 문헌의 매우 호의적인 비교 연구에도 불구하고 FDA가 어떠한 피브린 봉합제 제품도 승인하지 않는 정도로 심각하다.

1. Hennis, H.L., W.C. Stewart 및 E.K. Jeter. "Infectious disease risks of fibrin glue [letter]." Ophthaimic Surg 23 (9 1992): 640.

2. Berguer, R., R.L. Staerkel, E.E. Moore, F.A. Moore, W.B. Galloway 및 M.B. Mockus. "Warning fatal reaction to the use of fibrin glue in deep hepatic wounds. Case reports." J Trauma 31 (3 1991) · 408-11.

Berruyer, M., J. Amiral, P. Ffrench, J. Belleville, 0. Bastien, J. Clerc, A. Kassir, S. Estanove 및 M. Dechavanne. "Immunizatioon by bovine thrombin used with fibrin glue during cardiovascular operations. Development of thrombin and factor v inhibitors." J Thorac Cardicvasc Surg 105 (5 1993): 892-7.

3. Sanal, M. "Does fibrin glue cause foreign body reactions?[letter]." Eur J Pediatr Surg 3 (3 1993): 190.

Sanal, M., H. Dogruyol, A. Gurpinar 및 0. Yerci. "Does fibrin glue cause foreign body reactions?" Eur J Pediatr Surg 2 (1992): 285-6.

4. Thompson, D.F., Letassy, N.A. 및 Thomvson, G.D., Fibrin glue: a review of its preparation, efficacy, and adverse effects as a topical hemostat. Drug Intell Clin Pharm, 1988. 22(12): p. 946-52.

5. Siedentop, K.H., D.M. Harris 및 B. Sanchez. "Autologous fibrin tissue adhesive." Laryngoscope 95 (9 Pt 1 1985): 1074-6.

6. Epstein, G.H., R.A. Weisman, S. Zwillenberg 및 A.D. Schreiber. "A new autologous fibrinogen-based adhesive for otologic surgery." Ann Otol Rhinol Laryngol 95 (1 Pt 1 1986): 40-5.

7. Weis-Fogh, U.S. "Fibrinogen prepared from small blood samples for autologous use in a tissue adhesive system." Eur Surg Res 20 (5-6 1988); 381-9.

8. Hartman, A.R., D.K. Galanakis, M.P. Honig, F.C. Seifert 및 C.E. Anagnostopoulos. "Autologous whole plasma fibrin gel. Intraoperative procurement." Arch Surg 127 (3 1992): 357-9.

9. Kjaergard, H.K., Fogh Us Weis 및 J.J. Thiis. "Preparation of autologous fibrin glue from pericardial blood." Ann Thorac Surg 55 (2 1993): 543-4.

Kjaergard, H.K., U.S. Weis-Fogh, H. Sorensen, J. Thiis 및 I. Rygg. "A simple method of preparation of autologous fibrin glue by means of ethanol." Surg Gynecol Obstet 175 (1 1992): 72-3.

10. Casali, B., F. Rodeghiero, A. Tosetto, B. Palmieri, R. Immovilli, C. Ghedini 및 P. Rivasi. "Fibrin glue from single-donation autologous plasmapheresis." Transfusion 32 (7 1992): 641-3.

Moretz, W, Jr. , J Shea Jr. , J. R. Emmett 및 J Shea. "A simple autologous fibrinogen glue for otologic surgery." Otolaryngol Head Neck Surg 95 (1 1986): 122-4.

11. Matras, Helene, H.P. Dinges, H. Lassmann 및 B. Mamoli, "Zur nahtlosen

interfaszikularen Nerventransplantation im Tierexperiment." Wein Med Woschtr 122 (37 1972) : 517-523. First clinical results: Kuderma, H. 및 Helene Matras. "Die klinische Anwendung der Klebung von Nervenanastomosen mit Gerinnungssubstanzen bei der Rekonstruction verletzter peripherer Nerven." Wein Klin Wochenschr 87 (15 1975): 495-501.

12. 미국 특허 제4,414,976호 (1983) [Schwarz, O., Linnau, Y., Loblich, F. 및 Seelich, T., Tissue adhesive; freeze dried wound healing agent containing Fibrinogen, albumin, factor XIII, globulin, and plasminogen blocking Agent]; 미국 특허 제4,377,572호 (1982) [Schwarz, 0. , Linnau, Y., Loblich, F. 및 Seelich, T., Tissue adhesive; factor viii, Proteins, fibrinogen, globulin, albumin and plasmin inhibitor]; 미국 특허 제4,362,567호 (1982) [Schwarz, O., Linnau, Y., Loblich, F. 및 Seelich, T., Tissue adhesive; fibrinogen, factor XIII, albumin, plasmin inhibitor]; 미국 특허 제4,298,598호 (1981) [Schwarz, 0. , Linnau, Y., Loblich, F. 및 Seelich, T., Tissue adhesive; blood proteins; surgery. Immuno AG에 양도됨].

13. 유럽 특허 출원 제534,178호 (1993) [Martinowitz, U. 및 Bal, F., Improved tissue glue prepared by using cryoprecipitate; 0ctapharma AG에 양도됨].

14. 미국 특허 제4,427,650호 (1984) [Stroetmann, M., Enriched plasma derivative for advancement of wound closure and healing]; 미국 특허 제4,442,655호 (1984) [Stroetmann, M., Fibrinogen-containing dry preparation, manufacture and use thereof]; 미국 특허 제4,427,651호 (1984) [Stroetmann, M., Enriched plasma

derivative for enhancement of wound closure and coverage. Serapharm Michael Stroetmann DE에 양도됨].

15. 미국 특허 제4,650,678호 (1987) [Fuhge, P., Heimberger, N., Stohr, H.-A. 및 Burk, W., Readily Dissolvable Lyophilized Fibrinogen Formulation. Behringwerke Aktiengessellschaft에 양도됨]

16. 미국 특허 제5,260,420호 (1993) [Burnouf-Radosevich, M. 및 Burnouf, T., Concentrate of thrombin coagulable proteins, the method of obtaining same and therarpeutical use thereof. Centre Regional de Transfusion Sanguine de Lille에 양도됨]

17. 미국 특허 제5,226,877호 (1993) [Epstein, G.H., Method and apparatus for preparing fibrinogen adhesive from whole blood.]

18. 미국 특허 제5,030,215호 (1991) [Morse, P.S., Carpenter, J.F., Turner, A.D. 및 Cryolife, Preparation of fibrionogen/factor XIII precipitate. Cryolife에 양도됨] 청

<49> 구항 1: 전혈을 받아들이는 제1 용기(상단부, 하단부, 1개 이상의 유입구 및 1개 이상의 유출구를 가짐); 전혈을 상기 제1 용기로 운반하는 제1 도관(제1 용기의 유입구와 커플링된 말단을 가짐); 상기 제1 용기에서 적혈구 세포로부터 분리된 혈장을 받아들이는 제2 용기(상기 제2 용기는 상단부를 가지며, 상기 상단부에 인접한 비교적 넓은 직경의 제1 부분, 상기 제2 용기 내의 혈장으로부터 혈액 응고 인자 침전물을 받아들이는 상기 제1 부분 아래에 한정된 비교적 좁은 제2 부분, 및 비교적 좁은 부분이 상기 제1 부분으로부터 제2 부분으로 침전 혈액 응고 인자에 대한 좁은 통로를 한정하도록 하는 비교적 좁은 제2 부분 아래에 한정된 비교적 넓은 제3 부분; 및 혈장을 상기 제1 용기로부터 상기 제2 용기로 운반하는 제2 도관(상기 제1 용기의 유출구에 커플링된 제1 말단 및 상기 제2 용기의 유입구에 커플링된 제2 말단을 가짐)으로 이루어지는 혈액 응고 인자 수집 시스템.

19. 미국 특허 제5,290,552호 (1994) [Sierra, D.H., Brown, D.M. 및 Luck, E.E., Surgical adhesive material. Marrix Pharm Inc/Project Hear에 양도됨]

20. 국제 특허 출원 제92/22,312호 (1992) [Wadstroem, J., Tissue treatment composition comprising fibrin or fibrinogen and biodegradable and bicompatible polymer]

21. 미국 특허 제4,818,291호 (1989) [Iwatsuki, M. 및 Hayashi, T., Silk-fibroin and human-fibrinogen adhesive composition. Ajinomoto Co Inc에 양도됨]

22. 국제 특허 출원 제05067호 (1993) [Tse, D.C., Alpern, M., Enomoto, S.T., Garanchon, C.M., Liu, S.L., Mankaricous, S.S. 및 Thomas, W.R., Topical fibrinogen complex. Baxter Int Inc에 양도됨]

23. 유럽 특허 출원 제592,242호 (1993) [Edwardson, P.A.D., Fairbrother, J.E., Gardner, R.S., Hollingsbee, D.A. 및 Cederholm-Williams, S.A., Fibrin sealant composition and method for utilizing same. Squibb에 양도됨]

24. 미국 특허 제4,928,603호 (1990) [Rose, E. 및 Dresdale, A., Method of preparing a cryoprecipitated Suspension and use thereof; Columbia University에

<51> 양도됨] 청구항 1: (a) -80 ℃에서 6시간 이상 동안 혈액 전이 질환에 대해 선별된 단일 공여체로부터의 신선한 냉동 혈장을 냉동시키고, (b) 상등액 및 저온 침전된 현탁액(피브리노겐 및 인자 XIII를 함유)을 형성하도록 냉동 혈장의 온도를 높이고, (c) 저온 침전된 현탁액을 회수하는 것으로 필수적으로 이루어지는 피브리노겐 및 피브린 글루 제조에 있어서 전구체로서 유용한 인자 XIII를 함유하는 저온 침전된 현탁액의 제조 방법.

<52> 미국 특허 제 4,627,879호 (1986) [Rose, E. 및 Dresdale, A., Fibrin adhesive prepared as a concentrate from single donor fresh frozen plasma; Columbia University에 양도됨] 요약서: -80 ℃에서 6시간 이상 동안 혈액 전이 질환에 대해 선별된 단일 공여체로부터의 신선한 냉동 혈장을 냉동시킴으로써 피브리노겐 및 인자 XIII를 함유하는 저온 침전물을 제조하고, 온도를 높여 상등액 및 저온 침전된 현탁액(피브리노겐 및 인자 XIII를 함유)을 형성하고, 현탁액을 회수하는 것으로 이루어지는 피브린 글루의 제조 방법. 한정된 부피의 현탁액을 목적하는 위치에 가하고 트롬빈을 함유하는 조성물을 가하여 현탁액에서 피브리노겐 글루로 전환될 피브리노겐을 발생시킨 후, 겔 상태로 고체화한다.

<53> 25. 국제 특허 출원 제88/02259호 (1988) [Weis-Fogh, U., A Method and an Apparatus for preparing tissue repair promoting substances]

<54> 26. 미국 특허 제4,714,457호 (1987) [Alterbaum. R., Method and apparatus for use in preparation of fibrinogen from a patient's blood] 청구항 1: (a) 혈액 또는 혈장을 실질적으로 평평한 팩킷으로 전달하고; (b) 혈액 또는 혈장을 함유하고 있는 이 팩킷을 실질적으로 원주형인 삽입 고정 장치 어셈블리의 후미에 고정하고; (c) 이 원주형 삽입 고정 장치 어셈블리를 보완적인 원주형을 갖는 원심 분리 컵내에 삽입시켜 삽입 고정 장치 어셈블리가 상기 원심 분리 컵내에서 꼭 맞게 고정되도록 하고; (d) 상기 원심 분리 컵에 고정된 상기 삽입 고정 장치 어셈블리내에 고정된 상기 팩킷내에 함유된 혈액 또는 혈장을 원심 분리하고; (e) 상기 분리된 성분의 하나로부터 피브린 글루를 형성시키는 단계를 포함하는, 환자의 혈액을 회전기에 선회축으로 장착된 원주형 컵이 있는 원심 분리기로 분리시켜 혈장을 수득하고, 혈장을 원심 분리기로 분리시켜 농축된 피브리노겐을 제조하는, 피브린 글루의 자기 조직의 제조에서 사용하기 위한 방법.

27. 미국 특허 제5,185,001호 (1993) [Galanakis, D.K., Method of preparing autologous plasma fibrin and application apparatus therefore; Univ New York State Res Found에 양도됨]

28. 미국 특허 제4,735,616호 (1988) [Eibl, J., Habison, G., Redl, H. 및 Seelich, T., Arrangement for applying a tissue adhesive. Immuno AG에 양도됨]

29. 미국 특허 제4,631,055호 (1986) [Redl, H. 및 Habison, G., Apparatus for Applying a tissue adhesive. Immuno AG에 양도됨]

30. 미국 특허 제4,874,368호 (1989) [Miller, C.H., Altshuler, J.H. 및 Arenberg, I.K., Fibrin glue delivery system. Micromedics에 양도됨]

31. 미국 특허 제4,902,281호 (1990) [Avoy, D.R., Fibrinogen dispensing kit. Corus Med Corp에 양도됨]

32. 미국 특허 제5,219,328호 (1993) [Morse, B.S., McNally, R.T. 및 Turner, A.D.,

Fibrin sealant delivery method. Cryolife에 양도됨]

33. 미국 특허 제4,983,158호 (1991) [Headley, T.D., Plasmapheresis centrifuge bowl; disposable. Haemonetics Corp에 양도됨]; 미국 특허 제4,943,273호 (1990) [Pages, E., Disposable Centrifuge bowl for blood processing]; 미국 특허 제 4,303,193호 (1981) [Latham, A., Jr., Apparatus for separating blood into components thereof]; 미국 특허 제4,204,537호 (1990) [Latham, A., Jr. Process for pheresis procedure and disposable plasma]; 미국 특허 제 4,059,108 (1977) [Latham, A., Jr. Process for pheresis procedure and disposable pheresis bowl therefor. Haemonetics에 양도됨].

34. 미국 특허 제5,258,126호 (1993) [Pall, D.S. 및 Gsell, T.C., Method for obtaining platelets. Pall Corp에 양도됨]; 미국 특허 제5,100,564호 (1992) [Pall, D.B. 및 Gsell, T.C., Blood collection and processing system. Pall Corp에 양도됨]

35. 미국 특허 제5,217,627호 (1993) [Pall, D.B., Gsell, T.C., Matkovich, V.I. 및 Bormann, T., System and method for processing biological fluid; Pall Corp에 양도됨]; 미국 특허 제5,152,905호 (1992) [Pall, D.B., Gsell, T. 및 Mullers, B.T., [Method for processing blood for human transfusion. Pall Corp에 양도됨]; 미국 특허 제4,639,316호 (1987) [Eldegheidy, M. M., Automatic liquid component separator. Becton Dickinson & Co.에 양도됨]

36. 영국 특허 제854,715호 (1965) [Process for the Manufacture of Hydrophilic High Molecular Weight Substances from Dextran Substances]; 독일 특허 제

56,103호 (1965) [Gelotte, E.B. 및 Soderquist, B.G.F., [Hydroxy compound copolymers dextran-epichlorhydrin] Verfahren zur Herstellung Von substitution onsprodukten von Mischpolymerisaten]; 독일 특허 제1,443,359호 (1962) [Beil, W., Hoeppner, A., Wolff, H.J. 및 Beil, H., [Verfahren zur Herstellung von hochmolecularen hydrophilen Vernetzungsproducten von Polysacchariden oder deren Derivaten oder von Polyvinylalkohol in Form von Gelkoernern] High mol. wt. hydrophilic copolymer of a hydroxy group contng. non-ionic polymer is obtd. in the form of gel grains by reacting the polymer in the presence. Pharmacia에 양도됨].

37. 미국 특허 제4,537,767호 (1985) [Rothman, U.S. 및 Jacobsson, S.A., Method for cleansing fluid discharging skin surfaces, wounds and mucous membranes and means for carrying out the method; dry particles of water-insoluble swellable polymer. Pharmacia AB에 양도됨]; 미국 특허 제4,225,580호 (1980) [Rothman, U.S. 및 Jacobsson, S.A., Method for cleansing fluid discharging skin surfaces, wounds and mucous membranes and means for carrying out the method. Pharmacia AB에 양도됨]

38. 미국 특허 제5,206,023호 (1993) [Hunziker, E. B., Method and compositions for the treatment and repair of defects or lesions in cartilage]

39. 미국 특허 제5,190,057호 (1993) [Sarfarazi, F., Sarfarazi method of closing a corneal incision]; 미국 특허 제5,002,571호 (1991) [O'Donnell, F., E., Jr., Mammen,

E. 및 Nalbandian, R. M., Intraocular lens implant and method of locating and adhering within the posterior chamber]

40. 미국 특허 제5,156,613호 (1992) [Sawyer, P. N., Collagen welding rod material for use in tissue welding. Interface Biomedical Laboratories에 양도됨]

41. 미국 특허 제4,655,211호 (1987) [Sakamoto, I., Unigame, T. 및 Takagi, K., Hemostatic agent. Unitika KK에 양도됨]

42. 미국 특허 제4,453,939호 (1984) [Zimmermann, E. 및 Schiele, U., Agent for sealing and healing wounds. Horman-Chemie Munch에 양도됨]; 유럽 특허 제 102,773호 (1983) [Stemberger, A., Gewebeverklebarre kollagene Wundauflage. Dr. Ruhland Nachf. GmbH에 양도됨]

43. 미국 특허 제5,279,825호 (1994) [Wehling, P., Method of enhancing the regeneration of injured nerves and adhesive pharmaceutical formulation therefor Advanced Biofactures에 양도됨]; 미국 특허 제5,173,295호 (1992) [Wehling, P., Method of enhancing the regeneration of injured nerves and adhesive pharmaceutical formulation therefor; supplying collagenase to the zone of nerve injury during regeneration. Advanced Biofactures에 양도됨]

44. 미국 특허 제5,190,759호 (1993) [Lindblad, G. 및 Buckley, P., Composition and method for prevention of adhesions between body tissues. Kabi Pharmacia AB에 양도됨]

<59> **발명의 개요**

<60> 따라서, 본 발명의 목적은 피브리노겐, 프로트롬빈(트롬빈의 불활성 전구체) 및 다른 혈단백질 및 혈소판(트롬보사이트)을 함유하는 혈액으로부터 혈장 농축물(시트레이트, 헤파린 또는 다른 항응고제가 혈액 응고의 개시를 억제하기에 충분한 양으로 존재할 수 있음)을 신속하게 제조하기 위한 신규한 방법 및 장치를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 환자 자신의 혈액으로부터의 혈장 농축물(자기 조직의 조직 봉합제)을 신속하게 제조하기 위한 신규한 방법 및 장치를 제공하는 것이다.

<61> 본 발명의 다른 목적은 수술실에서 환자 자신의 혈액으로부터 농축물(즉석의 자기 조직의 조직 봉합제)을 신속하게 제조하기 위한 신규한 방법 및 장치를 제공하는 것이다.

<62> 본 발명의 다른 목적은 혈장 단백질 침전물로부터 유래하는 조직 봉합제보다 우수한 물리적, 화학적 및 생물학적 특성을 갖는 조성물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

<63> 본 발명 및 그의 수반하는 많은 잇점은 첨부 도면과 연결지어 하기의 상세한 설명을 참고함으로써 보다 잘 이해되어 보다 완전한 이해를 쉽게 얻을 것이다.

<64> 도 1은 개방 세포 소수성 발포체에 의한 혈장 분리, 및 정전기력에 의해 유지되는 비드를 갖는

개방 세포 발포체에 의한 혈장 농축을 이용하는 본 발명에 따른 일회용 카트리지의 실시 태양을 나타낸다.

<65> 도 2는 소결된 플라스틱 장벽에 의한 혈장 분리, 및 홈통 내에 분포된 비드에 의한 혈장 농축을 이용하는 본 발명에 따른 일회용 카트리지의 실시 태양을 나타낸다.

<66> 도 3은 환형 챔버에 의한 혈장 분리, 및 정전기력에 의해 유지되는 비드를 갖는 개방 세포 발포체에 의한 혈장 농축을 이용하는 본 발명에 따른 일회용 카트리지의 실시 태양을 나타낸다.

<67> 도 4는 펠트 매트에 의한 혈장 분리, 및 플라스틱 디스크로 함침된 비드에 의한 혈장 농축을 이용하는 본 발명에 따른 일회용 카트리지의 실시 태양을 나타낸다.

<68> 도 5는 본 발명에 따른 저분자량 성분 및 거대 분자 성분의 용액 (예: 혈장) 중의 1개의 확대된 농축제 비드를 나타낸다.

<69> 도 6은 혈장 농축물을 원심 분리한 후 주사기로 빼내고 있는, 본 발명에 따른 일회용 카트리지의 실시 태양을 나타낸다.

<70> 도 7은 두 성분을 혼합하기 위해 동축 니들을 사용하는 본 발명에 따른 도포기의 실시 태양을 나타낸다.

<71> 도 8은 단일 성분 피브린 봉합제를 도포하기 위해 활성화 카트리지를 사용하는 본 발명에 따른 도포기의 실시 태양을 나타낸다.

<72> 도 9는 본 발명에 따라 분자량이 10 kDa 이하인 비드를 사용하여 3배 농축시킨 단백질 용액 또는 현탁액에 대한 단백질 농도와 분자량 사이의 관계를 나타낸 그래프이다.

<73> **바람직한 실시 태양의 설명**

<74> 본 발명은 조직 봉합제를 제조하기 위한 일회용 카트리지를 갖는 저렴한 장치를 개시하고 있다. 본 발명의 장치는 특히 자기 조직의 조직 봉합제의 즉석 제조에 적용 가능하다. 일회용 카트리지는 손바닥에 맞출 수 있고, 용접 밀봉하여 환자의 혈액에 노출되지 않게 하고, 멸균을 유지한다. (상기 장치로부터 얻은) 혈소판이 풍부한 혈장 농축물을 칼슘 및 트롬빈 용액과 혼합한 직후 조직 봉합제를 도포하거나, 또는 물리적 또는 고정된 효소 활성화 직후 조직 봉합제를 도포하는 조직 봉합 방법이 개시되어 있다.

<75> 수술실에서 50 cc의 환자 혈액으로부터 5 cc의 봉합제를 제조하는데는 15 분 미만의 시간과 단지 하나의 간단한 작업 단계만을 필요로 한다. 본 발명의 방법은 수술실에서 행할 수 있기 때문에 트래킹 에러(tracking error)의 위험이 없다. 혈장 봉합제 및 그의 제조에 사용되는 추가의 화학 물질은 항응고제 (예: 시트레이트) 및 칼슘염 (예: 염화물)으로 제한될 수 있다.

<76> 접착 및 인장 강도는 유럽에서 시판 중인 혼주된 혈액 피브린 봉합제에 필적한다. 조직 봉합제가 환자 혈액의 피브린 용해를 억제하는 고농도의 천연 억제제를 함유하기 때문에 항피브린 용해제 (예를 들어, 아프로티닌)는 필요하지 않다. 조직 봉합제는 또한 환자의 혈소판, 및 상처 치료를 촉진시키는 시판 중인 피브린 봉합제에는 존재하지 않는 추가의 인자를 포함한다.

<77> 본 발명의 (자기 조직의) 조직 봉합제는 상처에 도포되는 동안에 칼슘 (및 임의로 소 또는 사람의 트롬빈)과 혼합됨에 따라 신속하게 겔화된다. 상기 봉합제는 FDA에서 승인되었거나 승인될 수 있는 성분만을 포함한다. 본 발명에 있어서, "조직 봉합제"란 혈병 형성, 조직 부착 및 상처 치유와 관련된 혈액에서 발견되는 성분 (바람직하게는, 혈액의 그러한 모든 성분)을 포함하므로, 전형적으로 저온 침전된 단백질만을 포함하고 혈소판은 포함하지 않는 이전의 "피브린 봉합제"와는 구별된다.

<78> 본 발명은 조직 봉합제를 제조하기 위해 칼슘/트롬빈과 혼합될 수 있는 혈소판이 풍부한 혈장 (PRP) 농축물의 제조 방법에 관한 것이다. 생성된 겔은 과학 문헌 또는 특허 문헌에서 이전에 기재되지 않았던 조성물이다.

<79> 이제 도면을 참조하면, 유사한 참조 번호는 몇몇 도면에서 동일한 또는 대응하는 부분을 나타내고, 더욱 구체적으로 도 1을 참조하면, 본 발명의 바람직한 실시 태양에서 시트레이트 처리된 혈장은 일회용 원심 분리 카트리지에서 2 단계로 처리된다. 제1 단계에서, 원심 분리력에 의해 적혈구 및 백혈구는 제1 분리기 (소수성 개방 세포 발포체)에 비가역적으로 수용되어 혈소판이 풍부한 혈장이 세포로부터 분리된다. 제2 단계에서, 혈소판이 풍부한 혈장은 물, 전해질 및 작은 단백질을 흡수하여 혈소판이 풍부한 농축물을 남게 하는 농축제 (예: 덱스트라노머 비드)와 접촉함으로써 농축된다. 따라서, 본 발명의 혈소판이 풍부한 혈장의 제조 방법은,

<80> (a) 전혈로부터 혈장 및 혈소판을 분리하는 단계,

<81> (b) 혈장 및 혈소판을 농축제와 접촉시켜 혈소판이 풍부한 농축된 혈장을 제조하는 단계, 및

<82> (c) 혈소판이 풍부한 농축된 혈장을 농축제로부터 분리하는 단계

<83> 를 포함한다.

<84> 바람직하게, 카트리지는 일회용이고, 오염되지 않도록 밀봉된다(예: 도 1 내지 도 4에서 하우징 (1) 참조). 본 발명의 방법을 밀봉 카트리지에서 수행할 경우, 상기 분리 단계(a)는 예를 들어, 혈액 충전 포트(유입구)와 유체 전달하는 카트리지의 제1 챔버에서 수행될 수 있다. 그 후, 혈장 및 혈소판은 (예를 들어, 제1 챔버와 유체 전달하는 카트리지의 제2 챔버 중에서) 혈장을 농축시키도록 충분히 농축제와 접촉될 수 있다. 밀봉된 일회용 카트리지의 잇점은 수술실에서 사용될 수 있어서 트래킹 에러 및 오염의 가능성이 없어진다는 것이다.

<85> 다른 실시 태양에서, 상기 방법은 혈소판이 풍부한 농축된 혈장을 제조하는 상기 방법이 추가로 분리 단계(a) 이전에 환자로부터 혈액을 수집하고, 유효량의 시트레이트를 가하여 혈액 응고를 억제하고

(표준 방법에 따라서), 표준량(예: 50 cc)의 혈액을 카트리지(1)의 혈액 충전 포트(유입구)(5)로 주입하는 것을 포함하는 자기 조직의 농축된 혈소판이 풍부한 혈장의 제조 방법이다.

<86> 혈장으로부터 압축된 세포를 쉽게 분리하기 위하여 통상의 원심 분리 기술 및 본 발명의 기술을 조합하여 혈액으로부터 혈장을 분리한다. 각 방향에서 3,000 내지 10,000 rpm 이하의 다양한 속도로 회전 가능하고 마이크로프로세서에 의해 조절 가능한(즉, 예정된 시간 동안 예정된 회전 속도로 회전하는) 원심 분리기가 공지되어 있고, 이 원심 분리기는 필요에 따라 혈장을 분리 및 농축하기 위한 본 발명의 장치와 함께 사용하기 위해 쉽게 적합화된다. 전혈을 주입한 후, 작업자는 누름 단추에 의해 마이크로프로세서로 조절되는 원심 분리를 개시한다. 농축물을 제거할 때까지의 모든 남은 단계를 자동화할 수 있다.

<87> 세포가 통상적으로 원심 분리(이 후, 전형적으로 흡기함) 중에 세포 덩어리로 압축되는 특성에 의해 혈장으로부터 분리됨에도 불구하고, 카트리지는 혈장을 다음 농축제 챔버로 신속하게 분리하도록 고안되었다. 실시 태양(도 1)에서, 적혈구 및 백혈구는 소수성 개방 세포 발포체(14)에 포획된 채로 남는다. 다른 실시 태양에서 (도 4)에서, 적혈구 및 백혈구는 펠트 애뉼러스(7)에 포획된 채로 남는다. 제3 실시 태양(도 2)에서, 세포는 기복이 있는 통로를 통해서 소결된 애뉼러스(8)로 이동하고, 외부에 포획된 채로 남는다. 제4 실시 태양(도 3)에서, 적혈구 및 백혈구는 좁은 틈(16)을 통해 이동하고, 원심 분리가 중지될 때 중력에 의해 외부 애뉼러스에 포획된 채로 남는다.

<88> 임의로, 혈장은 개방된 소수성 세포 발포체(15)를 갖는 정전기력에 의해 결합된 덱스트라노머 비드와 접촉할 수 있다(도 1 및 도 3의 장치 참조). 습윤될 경우, 비드는 그의 정전기적 인력을 잃고 팽윤하기 시작한다. 별법으로, 혈장은 예를 들어, 도 2의 장치에 따라서 유리 덱스트라노머 비드(2)와 접촉할 수도 있다. 원심 분리기는 유리 덱스트라노머 비드(2)를 농축제 컵 립(3) 외부에 균일하게 분포시키기에 충분한 속도로 수회 짧게 시계 방향으로 회전한 후 반시계 방향으로 회전할 수 있다. 이 후, 원심 분리기를 1,000 내지 10,000 rpm, 바람직하게는 3,000 rpm의 속도로 1 내지 10 분 동안 회전시켜 혈소판이 풍부한 혈장을 세포로부터 분리해낼 수 있다. 먼저, 전혈을 혈액 유입구(6)의 포어(4)를 통해 분리 챔버로 통과시킨다. 세포는 매트릭스(14)에 포획되거나(도 1 참조), 매트릭스(7)에 걸리거나(도 4 참조), 또는 소결된 소수성 플라스틱 또는 다른 다공성 물질(8)을 통과하여(도 2 참조) 챔버 중에는 혈소판이 풍부한 혈장이 남는다.

<89> 이어서, 원심 분리를 15 내지 90 초 동안 정지시킬 수 있다. 중력 하에서, 혈소판이 풍부한 혈장을 애뉼러스(또는 친수성 필터(9))을 통해 제2 챔버(10)(도 1 내지 도 4의 하위 챔버)으로 이동시킨다. 또한, 이 챔버는 제1 농축제 챔버로서 간주될 수 있다.

<90> 제1 농축제 챔버에서, 혈소판이 풍부한 혈장은 정전기력에 의해 개방된 소수성 세포 발포체(15)(도 1 및 도 3 참조), 또는 유리된 비드(2)(도 2 참조) 또는 디스크(들)(11)상으로 양각된 비드(도 4 참조)와 결합된 농축제 (예: 덱스트라노머 또는 폴리아크릴아미드)와 접촉된다. 덱스트라노머 및 폴리아크릴아미드 농축제는 시판되고 있다[예: 파마시아사 제품의 세파덱스(SEPHADEX), 및 바이오-래드 라보라토리즈사(Bio-Rad Laboratories) 제품의 바이오-겔(BIO-GEL)]. 별법으로, 덱스트라노머 또는 폴리아크릴아미드 흡수 비드 대신에 비드 또는 디스크 형태의 다른 농축제 (예: 파마시아사 제품의 세파덱스 수분 또는 물 흡수체), 다른 폴리아크릴아미드 흡수제, 실리카겔, 제올라이트, 덱스트라민, 알기네이트겔, 전분, 가교된 아가로스 등도 허용가능한 농축제이다.

<91> 본질적으로, 물을 흡수하고(즉, 물을 흡수할 수 있도록 충분히 건조함), 혈액 응고에 필수적인 단백질(예: 피브로노겐 및 인자 XIII)을 변성시키지 않는 임의의 물질을 농축제로서 적절하게 선택된 막으로서 사용할 수 있고, 또한 삼투압 구배를 사용할 수도 있다. 또한, 원심 분리기가 고압 증기 멸균기 같은 능력[즉, 승온 및(또는) 1 기압 이상의 압력에서 그 내용물을 회전시키는 능력]을 가질 경우, 예를 들어 승온(예: 30 내지 80 ℃, 바람직하게는 35 내지 60 ℃의 온도) 또는 감압/진공(예: 0.1 내지 500 Torr, 바람직하게는 1 내지 200 Torr)의 기계적 농축제가 농축제로서 사용될 수 있다. 그러나, 바람직한 농축제는 상기 및 하기와 같이 사용된 비드이다.

<92> 결과를 최대화 하기 위해, 원심 분리기를 처음에 저속 회전시키는 것은 농축제와 혈장을 혼합(그 결과, 접촉)시키는 데 도움을 준다. "저속 회전"이란 용어는 20 rpm 내지 500 rpm, 바람직하게는 100 rpm 내지 300 rpm의 원심 분리기 속도를 의미한다.

<93> 다공성 격벽(7, 8 또는 14)의 다공성 및 소수성은 발생되는 낮은 원심 분리력이 혈장을 격벽으로 추진시키기에는 충분하지만 표면 장력을 극복하기에는 불충분한 정도이며, 혈장은 내면의 구획에 남아있다.

<94> 비드(2)는 물, 이온 및 저분자량 단백질(51)로서 팽윤한다(도 5 참조). 농축제 비드(2)내의 포어(52)의 크기는 보다 고분자량의 단백질(53)이 비드 주위의 공간에서 농축되도록 선택된다. 소정의 특정 분자량 임계값을 갖는 단백질을 농축시키기 위한 시판 중인 비드 농축제를 모두 사용할 수 있다.

<95> 단백질 크로마토그래피 분야의 당업자들이 이해할 때는 "분자량 임계값"이란 용어는 평균 크기로 분포되는 매트릭스 내의 포어(예: 세파덱스)를 의미한다. 평균 크기 보다 작은 잔기, 예를 들면 평균 크기 보다 25 내지 50% 작은 잔기 (예, 단백질)는 비드내로 급속히 확산되고, 평균 크기 보다 큰 잔기, 예를 들면 평균 크기 보다 25 내지 50% 큰 잔기는 비드내로 확산되지 않는다. 평균 크기의 예를 들면, 25 내지 50%내의 크기를 갖는 단백질은 비드내로 (선택된 특정 비드에 따라) 서서히 확산된다. 따라서, 분자량 임계값이 10 kDa인 비드는 도 9에 그래프로 도시된 분자량에 따라 단백질을 농축시킨다.

<96> 따라서, 본 발명에서는, "고분자량 화합물"이란 용어는 농축제의 소정의 분자량 임계값보다 큰 분자량을 갖는 화합물을 의미한다. 혈장내의 고분자량 단백질의 예로는 선택된 분자량 임계값에 따라 피브리노겐 및 인자 XIII을 들 수 있다. 바람직한 농축제 물질로는 분자량 임계값이 100 kDa, 바람직하게는 30 kDa, 보다 바람직하게는 5 kDa인 비드 또는 물질이 포함된다.

<97> 혈소판이 풍부한 혈장 농축물은 조 혈장 성분 모두를 조 농도(이온 및 농축제 임계보다 작은 분자량을 갖는 화합물)로 또는 천연 발생 혈장보다 큰 농도 (예, 혈소판 및 농축제 임계보다 큰 분자량을

갖는 화합물)로 함유한다는 데 주목하는 것이 중요하다. 단백질 농축물은 농축되지 않은 혈장과 동일한 이온 농도를 갖는다.

<98> 비드의 양은 혈소판이 풍부한 혈장이 목적하는 양, 예를 들면 3 배(동일 용적의 밀착 충전된 구를 둘러싸는 소정 용적의 유체에 의해 달성되는 근사 농도 수준)로 농축되도록 선택한다. 데브리산(DEBRISAN)[상품명, 존슨 앤드 존슨사(Johnson and Johnson) 제]을 사용하는 경우, 3배로 농축시키기 위해서는 혈장 10 cc 당 약 2.6 g이 요구된다.

<99> 농축제 내에 물 및 저분자량 용질이 흡수된 후에는, 회전 속도가 증가되어 (예, 1,000 내지 10,000 rpm, 바람직하게는 약 3,000 rpm), 혈소판이 풍부한 농축 혈장이 필터(12)를 통해 외부 구획내로 보내진다. 이어서, 원심 분리기가 멈춰지고, 중력하에 혈소판이 풍부한 농축 혈장은 저부 격벽(13)에 수집될 수 있다. 혈소판이 풍부한 농축 혈장은 자발적인 겔화 또는 다른 유해 효과 없이 연장된 기간(예: 수 시간)동안 남아 있을 수 있다.

<100> 이어서, 혈소판이 풍부하고 즉시 사용가능한 농축 혈장은 도 6에서와 같이 주사기(16)으로 제거할 수 있다.

<101> 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 농축 혈장과 활성화제(트롬빈/칼슘 용액 또는 후술하는 바와 같이 분쇄된 혈소판)를 접촉시켜서 활성화된 혈장 농축물을 제조하는 단계, 및 봉합을 필요로 하는 조직에 활성화된 혈장 농축물을 도포하는 단계를 포함하는 조직 봉합 방법에 관한 것이다.

<102> 조직을 봉합하는 방법의 일 실시 태양에서는, 농축된 혈장을 응고시키기 위한 유효량의 트롬빈 및 칼슘을 함유하는 따로 제조한 용액을 (저온 침전시킨 피브리노겐에 대한 문헌에 기술되어 있는 방법에 따라) 농축된 혈장과 합칠 수 있다. 일단 합쳐지면, 용액 및 농축 혈장은 급속하게 겔화되어 조직 봉합제를 형성한다. 상술한 것보다 탁월한 특징을 갖는 일 실시 태양이 도 7에 도시되어 있다. 주사기의 원통에서, 트롬빈 및 칼슘 용액을 함유하는 원통형 챔버(31)은 혈소판이 풍부한 농축 혈장을 함유하는 환형 챔버(32)에 의해 둘러싸인다. 플런저(30)에 의해 이 용액은 동축 니들(33)(트롬빈) 및 (35)(농축 혈장)를 통해 장치를 떠나 선단(36)에서 혼합된다. 임의의 슬리브(34)에 의해 적절한 혼합이 보장되고, 움츠러들어 조숙한 겔이 용이하게 제거되도록 노출될 수 있다.

<103> 또다른 임의의 실시 태양에서는, 피브리노겐을 활성화시키도록 디자인된 니들 팁을 사용하여 트롬빈을 추가함이 없이 단일 성분의 농축물 (즉, 농축 혈장)을 적용할 수 있다. 이 실시 태양에서는, 봉합을 필요로 하는 조직에 적용하기 직전에 또는 적용하는 동안에 농축물에 칼슘을 첨가한다. 도 8은 주사기(21) 및 혈소판이 풍부한 혈장이 비이동성 단백질분해 효소, 예를 들면 소의 트롬빈에 의해 활성화되도록 통과하는 활성화 카트리지(22)에 의해 분리된 도포기 니들 팁(23)이 도시되어 있다.

<104> 또다른 임의의 실시 태양에서는, 혈소판을 분쇄하도록 디자인되는 니들 선단을 사용하여 트롬빈을 사용하지 않고 단일 성분 농축물 (즉, 농축 혈장)을 적용할 수 있다. 이 실시 태양에서는, 봉합을 필요로 하는 조직에 적용하기 직전에 또는 적용하는 동안에 칼슘을 농축물에 첨가한다. 도 8에는 주사기(21) 및 혈소판이 풍부한 혈장이 예를 들면 나일론면에 의해 활성화되도록 통과하는 활성화 카트리지(22)에 의해 분리된 도포기 니들 팁(23)이 도시되어 있다.

<105> 또한, 본 발명은,

<106> 유입구,

<107> 혈장 및 혈소판을 전혈로부터 분리시키기 위한 제1 분리기를 포함하여 혈소판이 풍부한 혈장을 형성하고, 상기 유입구와 유체 전달이 가능한 제1 챔버,

<108> 혈소판이 풍부한 혈장을 농축시키기 위한 농축제 및 농축제로부터 혈소판이 풍부한 농축 혈장을 분리하기 위한 제2 분리기를 갖고, 제1 챔버와 유체 전달이 가능한 제2 챔버, 및

<109> 혈소판이 풍부한 농축 혈장을 배출시키기 위한 유출구

<110> 를 포함하는 혈소판이 풍부한 혈장을 농축하기 위한 장치에 관한 것이다.

<111> 또다른 실시 태양에 있어서, 제1 분리기는 표면 장력하에 내부의 적혈구 및 백혈구를 포획하는 소수성 개방 세포 발포체를 포함한다.

<112> 또다른 실시 태양에 있어서, 제1 분리기는 원심 분리력하에서는 적혈구 및 백혈구를 통과시키지만 원심 분리력의 해제시에는 적혈구 및 백혈구의 통과를 막는 다공성 플라스틱 격벽을 포함한다.

<113> 또다른 실시 태양에 있어서, 제1 분리기는 적혈구 및 백혈구가 외부 애뉼러스로 통과되게 하고, 원심 분리기가 중지됐을 때 중력에 의해 유지되는 혈장으로부터 분리되게 하는 제1 챔버의 상부에서 애뉼러스를 포함한다.

<114> 장치의 또다른 실시 태양에 있어서, 농축제는 종이 디스크 또는 (시판 중인 물질로 제조된) 복수개의 디스크 상에 삽입되거나, 또는 정전하적으로 또는 다른 힘에 의해 개방 세포 매트릭스에 점착될 수 있다.

<115> 본 발명의 카트리지의 바람직한 실시 태양의 여러 디자인이 가능하다 (예, 도 1 내지 4). 제1 및 제2 챔버의 디자인은 거의 독립적이며, 원하는 경우에 단일 카트리지로 합쳐질 수 있다. 도시된 4개의 디자인은 모두 1개 이상의 농축 챔버와, 유체 전달이 가능한 1개 이상의 분리 챔버를 갖는다.

<116> 가장 바람직한 실시 태양인 도 1은 세포로부터 혈장을 분리하기 위한 소수성 개방 세포 발포체(14)를 사용하여 개방 세포 발포체(15) 내의 정전력에 의해 유지되는 비드에 의해 혈장 농도에 영향을 미친다. 도 2에 도시된 또다른 바람직한 실시 태양에서는 소결된 플라스틱 배리어(8)에 의한 혈장 분리 및 홈통(2)에 분포된 비드에 의한 혈장 농축이 이용된다. 도 3에 도시된 또다른 바람직한 실시 태양에서는 환형 챔버(16)에 의한 혈장 분리 및 개방 세포 발포체(15)내의 정전력에 의해 유지되는 비드에 의한 혈장

농축이 이용된다. 도 4에 도시된 또다른 바람직한 실시 태양에서는 펠트 매트(7)에 의한 혈장 분리 및 플라스틱 디스크(12) 내로 함침되는 비드에 의한 혈장 농축이 이용된다.

<117> 각각의 분리기는 각각의 농축제와 함께 사용될 수 있다. 4개의 분리기를 3 개의 농축제와 조합하여 일회용 카트리지를 위한 12개의 가능한 배치를 제공할 수 있다.

<118> A. 소수성 개방 세포 발포체 혈장 분리제 및 소수성 개방 세포 발포체 농축제 중의 덱스트라노머 비드

<119> 도 1에는, 준비된 카트리지가 우측 절반에 도시되어 있고 액체의 통로가 좌측 절반 위에 점선 화살표에 의해 도시되어 있다. 전체 챔버는 전혈 유입구용 마개(5)를 제외하고는 반경 방향으로 대칭적이다. 수납 컵(6)은 원심 분리력으로 인해 혈액이 필터 (4)를 통과할 때까지 혈액을 보유한다. 분리 챔버에서는, 원심 분리력에 의해 세포가 소수성 개방 세포 발포체(14) 내로 통과하여 그 안에 축적되며, 계속되는 원심 분리력에 의해 세포가 개방 세포 발포체의 애뉼러스 내로 이동하고 혈소판이 풍부한 혈장이 분리 챔버내에 남게 된다. 소수성 개방 세포 발포체(14)는 벌집형 소수성 물질이며, 이로 인해 유체 및 소형 입자(예: 개방 세포 폴리우레탄 발포체)가 자유로이 유동하는 것이 가능하다. 젖은 스폰지와 마찬가지로, 발포체는 표면장력에 기인한 특정 헤드의 압력에 대해 액체를 보유한다. 따라서, 혈세포 또는 다른 현탁된 입자들은 원심 분리기가 멈추었을 때 발포체 내에 포획되어 남고, 혈소판이 풍부한 혈장은 중력하에 표면으로부터 배출된다. 발포체는 강성 또는 가요성일 수 있으며, 몰딩 또는 다이-커팅에 의해 장치에 적절한 환형의 형태로 성형될 수 있다. 이들 부분의 크기는 충전된 세포(예: 적혈구 및 백혈구) 층이 원심 분리기가 중지됐을 때 세포들을 보유하는 외부 개방 세포 발포체 챔버내에 충분히 함유되도록 하는 크기를 갖는다.

<120> 혈소판이 풍부한 혈장이 농축 챔버(10) 내의 농축제(예: 덱스트라노머) 비드(2)와 접촉할 때 농축이 일어난다. 이들 비드는 크로마토그래피(파마시아사 제품의 세파덱스, 바이오-래드 라보라토리즈사 제품의 바이오-겔 P) 및 데브리딩(debriding) [제이 앤드 제이사(J & J) 제품의 데브리산]에 사용되는 분자체일 수 있거나, 또는 실리카겔, 제올라이트, 덱스트라민, 알기네이트겔, 전분, 가교된 아가로스 등을 포함할 수 있다. 데브리산은 세파덱스 G-25와 유사한 것으로 보이며 둘다 시판 중이다.

<121> 비드는 정전력에 의해 소수성 개방 세포 발포체(15)의 표면상에 유지된다. 소수성 개방 세포 발포체(15)는 벌집형 소수성 물질이다. 혈소판이 풍부한 혈장이 농축 챔버(10)으로 들어간 후에는, 카트리지(1)은 부드럽게 회전하여 혈소판이 풍부한 혈장을 농축제 비드(2)와 혼합시킨다. 유체가 개방 발포체(15)에 침투함에 따라, 비드는 발포체에 대한 친화력을 잃고 팽윤하기 시작한다. 발포체(15)는 발포체(14)와 동일한 물질(예: 개방 세포 폴리우레탄)로 제조될 수 있지만, 상이한 다공도를 가질 수 있다. 발포체(14 및 15)의 다공도는 보유되는 입자의 크기 및(또는) 형태를 기준으로 하여 경험적으로 선택된다(예: 발포체(14)에 의한 세포 및 발포체(15)에 의한 농축제 비드). 시판 중인 개방 세포의 3차원 폴리우레탄 발포체에서, 다공도는 밀도와 상관관계가 있는 것으로 알려져있다(예를 들면, 3제곱 피트 당 중량 단위로 측정됨). 수 분(예: 1 내지 10 분, 바람직하게는 3 내지 5 분) 후, 농축이 완성된다. 약 3배의 농축이 밀착 충전된 구를 둘러싸는 유체에 상응하므로 3 배의 농축이 최적이다. 3배를 넘는 농축도 가능하지만, 최선의 결과를 달성하기 위해서는 제1 챔버내에 농축된 혈장의 추가 농축을 위해 제2 농축 챔버를 사용하여야 한다. 따라서, 2 개의 농축 챔버를 포함하는 3 개의 챔버 카트리지인 경우에는 9 배 농축도 가능하다.

<122> 농축이 완성되는 경우에는, 원심 분리기는 그의 회전 속도를 증가시키고 증가된 원심 분리력에 의해 혈소판이 풍부한 농축 혈장이 소수성 애뉼러스 (12)를 통과하게 된다. 소결 플라스틱(12)[예, 포렉스(POREX)]는 다공성 구조물을 만들기 위해 융합된 플라스틱의 소형 입자로 이루어진다.

<123> 유체 및 소립자들은 물질이 습윤될 때 융합 플라스틱 입자들간의 공간에 의해 한정된 사행성 경로를 통해 자유로이 통과할 수 있다. 만일 플라스틱이 구체적으로 제형화되거나 처리되지 않는다면, 소결된 플라스틱은 소수성이 될 것이고, 건조 상태에서 물의 유입에 대한 내성을 제공할 것이며, 경로의 크기가 감소되면 점점 더 커진다. 이러한 "도입 압력"의 성질은 실질적으로 유체를 물질로 유입시키지 않고 소수성인 다공성 격벽을 습윤화시킨다. 보다 큰 압력, 즉 원심 분리력이 증대될 때, 이러한 저항력은 극복되며, 유체는 장벽을 통해 도입되어 다공성 벽을 통과한다.

<124> 원심 분리가 종결되면, 농축된 혈소판이 풍부한 혈장은 중력하에서 하부로 이동하며, 도 6에서와 같이 필터(13)을 통해 제거될 것이다.

<125> 최종적으로, 농축제 컵(10)은 저부 챔버에서 상부 챔버로 구멍을 내어 혈장에 의해 저부 챔버로부터 공기를 치환시키는 역 깔때기와 같은 형상을 가짐을 유의해야 한다.

<126> B. 소수성 다공성 벽 혈장 분리제 및 유리된 덱스트라노머 비드 농축제

<127> 도 2에서, 기존의 카트리지는 우측 절반에 있고, 액체의 경로는 좌측 절반상에 대시된 화살표에 의해 표시된다. 전체 챔버는 전혈 유입용 격벽(5)을 제외하고는 방사상 대칭이다. 수용컵(6)은 원심 분리력으로 인해 혈액이 필터(4)를 통과할 때까지 혈액을 보유한다. 분리실에서, 원심 분리력은 세포가 필터(8)의 사행성 채널을 통과하여 외부 애뉼러스에 축적되게 한다. 필터(8)(즉, 80μ 포렉스)는 다공성 구조를 만들기 위해 융합된 플라스틱의 소립자들로 구성된다. 유체 및 소립자들은 물질이 습윤될 때 융합 플라스틱 입자들간의 공간에 의해 한정된 사행성 경로를 통해 자유로이 통과할 수 있다. 만일 플라스틱이 구체적으로 제형화되거나 처리되지 않는다면, 소결된 플라스틱은 소수성이 될 것이고, 건조 상태에서 물의 유입에 대한 내성을 제공할 것이며, 경로의 크기가 감소되면 점점 더 커진다.

<128> 이러한 "도입 압력"의 성질은 실질적으로 유체를 물질로 유입시키지 않고 소수성 다공성 벽을 습윤화시킨다. 보다 큰 압력, 즉 원심 분리력이 증대(즉, 1,000 내지 10,000 rpm 또는 그 이상)될 때, 이러한 저항력은 극복되며, 유체는 장벽을 통해 도입되어 다공성 벽을 통과한다. 이는 혈장과 혈소판을 챔버내에 방치시킨다. 각 부분들의 크기는 충전된 세포(즉, 적혈구 및 백혈구) 층은 필터 및 외부 애뉼러스 내에 완전히 포함되도록 정한다. 원심 분리가 종결되고, 혈소판이 풍부한 혈장이 친수성 여과 깔때기(9)

를 통과할 때, 중력은 세포가 필터(8)를 통과하여 분리실로 되돌아가도록 하기에는 불충분하다.

<129> 친수성 여과 깔때기(9)는 상부 및 하부 구획을 분리하여 느슨한 비드가 선적 및 조작하는 동안 상부 구획으로 텀블될 수 없다. 이 물질은 예컨대 필터(8)에서 사용된 것과 유사할 수 있다. 그러나, 혈액 세포로부터 분리후 하부 구획으로 (중력에 의해) 혈장의 자유 배액을 제외할 정도로 도입 압력을 높게 하지 않으려면, 이 물질은 바람직하게는 농축실(10)에서 비드를 확실하게 포획하기에 최소로 충분한 유효한 다공도를 가질 것이다. 또한 도입 압력을 더욱 감소시키기 위해서는 이 물질을 보다 친수성이 되도록 하는 방법(예: 계면 활성제로 처리, 혼합 또는 코팅된 혈장 또는 코로나)으로 처리하는 것이 가장 바람직할 것이다.

<130> 농축은 혈소판이 풍부한 혈장이 농축실(10)에서 농축제 비드(2)와 접촉할 때 발생한다. 이들 비드들은 크로마토그래피에서 사용된 분자체(파마시아사 제품의 세파덱스, 바이오-래드 래보라토리즈사 제품의 바이오-겔 P) 및 데브리딩(제이 앤드 제이사 제품의 데브리산)일 수 있거나, 또는 실리카겔, 제올라이트, 덱스트라민, 알기네이트겔, 전분, 가교된 아가로오스 등을 포함할 수 있다. 데브리산은 세파덱스 G-25와 유사한 것으로 보이며 둘다 시판 중이다.

<131> 비드는 챔버내에 밀봉되지만, 선적하는 동안 불균일하게 분포될 수 있다. 친수성 필터(9)는 농축실(10)내에 비드를 보유한다. 전혈을 첨가한 직후, 카트리지를 수 회 조용히 회전 및 역회전시켜 립(3) 배면에 비드를 균일하게 분포시킨다.

<132> 혈소판이 풍부한 혈장이 농축실(10)로 도입될 때, 카트리지(1)는 조용히 회전되어 혈소판이 풍부한 혈장을 농축제 비드(2)와 혼합시킨다. 가장 우수한 결과를 수득하기 위해서는, 각 비드 둘레에 단백질 이 국부적으로 농축되어 흡수를 지연시키는 경향으로 인해 슬러리를 움직이는 상태로 두는 것이 중요하다. 수 분(즉, 1 내지 10 분, 바람직하게는 3 내지 5 분) 후, 농축은 종결된다. 대략 3 배 정도의 농축이 밀착 충전된 구를 둘러싸는 유체와 상응하므로 3 배 농축이 최적임에 유의해야 한다. 3 배 이상의 농축도 가능하기는 하지만, 가장 우수한 결과를 달성하기 위해서는 제2의 농축 챔버를 사용하여야 한다. 따라서, 두 개의 농축 챔버를 포함하는 제3 챔버 카트리지인 경우에는 9 배 농축도 가능하다.

<133> 농축이 종결되면, 원심 분리기는 그의 회전 속도를 증대시키고, 증대된 원심 분리력은 농축된 혈소판이 풍부한 혈장이 소수성 애뉼러스를 통과하게 한다. 최종적으로 원심 분리가 종결되면, 농축된 혈소판이 풍부한 혈장은 중력하에 하부로 이동하여 제거된다.

<134> 최종적으로, 농축제 컵(10)은 저부 챔버에서 상부 챔버로 통풍시켜 혈장에 의해 저부 챔버로부터 공기를 치환시키는 역 깔때기와 같은 형상을 가진다.

<135> C. 개방 세포 소수성 발포체 농축제에서의 환형 챔버 혈장 분리기 및 덱스트라노머 비드

<136> 많은 면에서 도 1에 유사한 도 3에서, 기존의 카트리지는 우측 절반에 보이고, 액체의 경로는 좌측 절반에 대시된 화살표에 의해 표시된다. 전체 챔버는 전혈 유입용 격벽(5)을 제외하고는 방사상 대칭되어 있다. 수용 컵(6)은 원심 분리력으로 인해 혈액이 필터(4)를 통과할 때까지 혈액을 보존하고 있다. 분리실에서, 원심 분리력은 세포들이 립(16)의 상부를 통해 외부 환상 챔버내로 이동하여 여기에 축적시키고, 연속 원심 분리력은 세포들이 혈소판이 풍부한 혈장 및 외부 애뉼러스로 이동하여 분리실내에 남게 한다. 각 부분들의 크기는 충전된 세포(즉, 적혈구 및 백혈구) 층이 완전히 외부 환형 챔버 내에 포함되어 원심 분리가 종결될 때 세포를 보유하도록 한다. 원심 분리가 종결될 때, 혈소판이 풍부한 혈장은 농축실(10)로 유입된다. 농축은 혈소판이 풍부한 혈장이 농축실(10)에서 농축제 비드(2)와 접촉시 발생한다. 이들 비드들은 크로마토그래피에서 사용된 분자체(파마시아사 제품의 세파덱스, 바이오-래드 래보라토리즈사 제품의 바이오-겔 P) 및 데브리딩(제이 앤드 제이사 제품의 데브리산)일 수 있거나, 또는 실리카겔, 제올라이트, 덱스트라민, 알기네이트겔, 전분, 가교된 아가로스 등을 포함할 수 있다. 데브리산은 세파덱스 G-25와 유사한 것으로 보이며 둘다 시판 중이다.

<137> 도 1에서, 이들 비드들은 개방 세포 소수성 발포체(15)의 표면에 대한 정전기력에 의해 유지된다. 개방 세포 소수성 발포체(15)는 벌집형 소수성 물질이다. 혈소판이 풍부한 혈장이 농축 챔버(10)에 도입될 때, 카트리지(1)은 조용히 회전하여 혈소판이 풍부한 혈장을 농축제(덱스트라노머) 비드(2)와 혼합시킨다. 유체가 개방 발포체(15)를 통과할 때, 비드들은 자신의 발포체에 대한 친화력을 상실하고 팽윤하기 시작한다. 가장 우수한 결과를 수득하기 위하여, 각 비드 둘레에 단백질이 국부적으로 농축되어 흡수를 지연시키는 경향으로 인해 슬러리를 움직이는 상태로 두는 것이 중요하다. 수 분 후에 농축은 종결된다. 대략 3 배 정도의 농축이 밀착 충전된 구를 둘러싸는 유체와 상응하므로 3 배 농축이 최적임에 유의해야 한다. 3 배 이상의 농축도 가능하지만, 가장 우수한 결과를 달성하기 위해서는 제2 농축 챔버를 사용하여야 한다. 따라서, 2 개의 농축 챔버를 포함하는 제3 챔버 카트리지인 경우에 9 배 농축이 가능하다.

<138> 농축이 종결되면, 원심 분리기는 그의 회전 속도를 증대시키고, 증대된 원심 분리력은 농축된 혈소판이 풍부한 혈장이 소수성 애뉼러스(12)을 통과하게 한다. 소성된 플라스틱(12)는 포렉스로 구성되며, 다공성 구조를 만들기 위해 융합된 플라스틱의 소립자들을 포함한다. 유체 및 소립자들은 물질이 습윤될 때 융합 플라스틱 입자들 간의 공간에 의해 한정된 사행성 경로를 통해 자유로이 통과할 수 있다. 만일 플라스틱이 구체적으로 제형화되거나 처리되지 않는다면, 소결된 플라스틱은 소수성이 될 것이고, 건조 상태에서는 물의 유입에 대한 내성을 제공할 것이며, 경로가 감소되면 점점 더 커진다. 이러한 "도입 압력"의 성질은 실질적으로 유체를 물질로 도입시키지 않고 소수성 다공성 벽면을 습윤화시킨다. 보다 큰 압력, 즉 원심 분리력이 증대(즉, 1,000 내지 10,000 rpm 또는 그 이상)될 때, 이러한 저항력은 극복되며, 유체는 장벽을 통해 도입되어 다공성 벽을 통과한다.

<139> 원심 분리가 종결되면, 농축된 혈소판이 풍부한 혈장이 하부로 이동하여 도 6에서 보는 바와 같이 필터(13)를 통해 제거될 것이다.

<140> 최종적으로, 농축제 컵(10)은 저부 챔버에서 상부 챔버로 구멍을 내어 혈장에 의해 저부 챔버로부터 공기를 치환시키는 역 깔때기와 같은 형상을 가짐을 유의해야 한다.

<141> D. 섬유성 매트릭스 혈장 분리기 및 덱스트라노머 함침 디스크 농축제

<142> 도 4는 많은 면에서 이전의 도면과 유사하다. 도 1과 같이, 기존의 카트리지는 우측 절반에 있고, 액체 경로는 좌측 절반에서 대시된 화살표에 의해 나타난다. 전체 챔버는 격벽(5)(전혈 유입)을 제외하고는 방사상 대칭이다.

<143> 분리는 펠트 또는 발포체 매트(7)로 세포를 유인함으로써 진행된다. 각 부분들의 크기는 충전된 세포(즉, 적혈구 및 백혈구) 층이 완전히 펠트 또는 발포체 필터내에 포함되어 원심 분리가 종결될 때 세포를 보유하도록 한다.

<144> 상기 디자인에서, 덱스트라노머 비드들의 균일한 분포는 덱스트라노머 비드로 엠보싱된 플라스틱 디스크를 사용하여 진행된다. 이는 플라스틱을 가열 또는 용매 연화후, 덱스트라노머 비드를 침지시키거나 접착제를 사용하여 플라스틱에 비드를 고정시킴으로써 진행될 수 있다. 비드들이 팽윤될 때 이들은 디스크로부터 탈착된다. 농축된 혈소판이 풍부한 혈장의 분리는 농축된 혈소판이 풍부한 혈장을 제조하는 본 발명의 방법의 상기 설명에 기재된 대로 진행한다.

<145> E. 일회용 카트리지의 제조 방법

<146> 상기 카트리지로 이루어지는 다양한 견고 플라스틱 성분들은 사출 성형에 의하거나 또는 가압 또는 의한 진공 형성, 회합 및 통상의 방법에 의한 밀봉(예, 접착 또는 용접)에 의해 제조된다. 도1 내지 도4로부터 플라스틱 직조 기술 계통의 숙련자에게 제조는 비교적 단순하고 저렴함이 명백할 것이다. 최종 회합된 생성물은 포장되고 방열 멸균되어 배포 준비된다.

<147> F. 혈장 농축물, 혈소판이 풍부한 혈장 농축물 및 조직 봉합제

<148> 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의한 혈장 농축물에 관한 것이다. 본 혈장 농축물은 혈소판이 풍부한, 혈소판 빈약 또는 무혈소판(즉, 혈소판 농도는 제한이 없음)일 수도 있으나, 바람직하게는 혈소판이 풍부한 것이다. 혈소판의 농도는 공지된 방법 및(또는) 공지의 혈소판 침전 특성에 따라 침전율에 의해 제어될 수 있다. 바람직하게는, 혈소판 농도는 (전혈이 취해지는 환자에게 투여되는) 자율적이다.

<149> 한 실시 태양에 있어서, 본 혈장 농축물은 혈소판, 5 내지 400 ㎎/㎖의 피브리노겐, 0.5 내지 35 ㎎/㎖의 피브리노넥틴 및 물과 생리학상 허용되는 농도의 생리학상 허용되는 무기 및 유기 이온으로 이루어지는 생리학상 허용되는 담체를 포함한다. 바람직한 실시 태양에 있어서, 혈장 농축물은 전혈로부터 제조되고, 혈소판은 동일한 전혈로부터의 얻은 농축되지 않은 혈장 중의 혈소판 농도에 비하여 적어도 1.5배로 농축된다.

<150> 본 발명의 혈장 농축물은 혈장의 응고 시간을 감소시키는데 유효한 양의 항생 물질, 콜라겐 플리스, 콜라게나제, 히알우론산, 상처 치유 인자, 아연 이온으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 화합물, 및 생물학적으로 허용되는 염료를 추가로 포함한다. 생물학적으로 허용되는 바람직한 염료에는 디술파이드 블루가 있고, 혈장 농축물을 조직에 적용시키는 동안 이를 육안으로 검출하기에 충분한 양으로 함유된다. 바람직한 실시 태양에서, 혈장 농축물은 제약학적 활성 화합물, 특히 외래성 미생물에 의한 감염 가능성을 감소시키는 항생 물질을 추가로 포함한다.

<151> 본 발명은 또한 본 발명의 혈장 농축물 및 활성화제로 이루어지는 조직 봉합제에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 조직 봉합제 중의 혈장 농축물은 혈소판이 풍부한 혈장 농축물이다.

<152> 본 발명의 조직 봉합제의 한 실시 태양에서, 활성화제는 혈장 농축물의 겔화를 가능케 하기에 충분한 양의 트롬빈 및 칼슘의 혼합물이다. 또다른 실시 태양에서, 활성화제는 자기조직의 트롬빈 및 혈소판이다.

<153> G. 2성분 피브린 봉합제 혼합 장치 및 방법

<154> 2 성분(예: 농축된 혈소판이 풍부한 혈장 및 칼슘/트롬빈 용액)을 가지는 평행 주사기를 적용 부위에서 성분을 혼합하면서 동축 니들에 모아서 조기 겔화를 피할 수 있다: 도 7 참조, 주사기의 원통에서, 트롬빈 및 칼슘 용액을 함유하는 실린더형 챔버 (31)은 농축된 혈소판이 풍부한 혈장을 함유하는 환형 챔버 (32)에 의해 둘러싸인다. 플런저(30)은 용액이 동축 니들을 통해 장치를 빠져나가서 팁(36)에서 혼합하게 한다. 임의 슬리브(34)는 적절한 혼합을 가능하게 하며 수축되어 조기 겔화된 겔을 노출시켜 용이하게 제거할 수 있다.

<155> H. 혈소판이 풍부한 혈장 농축물을 위한 분산제/활성화제

<156> 피브린 봉합제를 사용하는 대부분의 사용자는 겔화를 유발시키는데 소 트롬빈을 이용하는 것에 의존하여 왔다. 본 발명의 바람직한 실시 태양에서는, 최종 제제에 소단백질을 과량 사용하는 것을 피하는 것이 바람직하다. 따라서, 응고 과정의 자가 촉매 활성화를 일으키기 위한 소량의 소 또는 다른 혈전형성 효소를 사용하는 방법 및 장치가 예상된다. 도 8은 피브리노겐을 피브리노겐을 피브린으로 전환시키기 위한 고정화 트롬빈에 의한 활성화를 위해 혈소판이 풍부한 혈장이 통과하는 활성화 카트리지(22)에 의해 분리되는 주사기(21) 및 도포기 니들 팁(23)을 보여준다.

<157> 추가의 임의의 실시 태양에서, 혈소판을 파괴시키도록 고안된 니들을 사용하여 트롬빈을 사용하지 않는 단일 성분 농축물(즉, 농축된 혈장)을 적용할 수 있다. 도 8은 예를 들면 나일론면에 의한 활성화를 위해 혈소판이 풍부한 혈장이 통과하는 활성화 카트리지(22)에 의해 분리되는 주사기(21) 및 도포기 니들 팁(23)을 나타낸다. 이 실시 태양에서는, 봉합을 필요로 하는 조직에 농축물을 도포하기 직전 또는 적용하는 동안에 농축물에 칼슘을 첨가한다.

<158> 노출 표면 대 공극 부피의 비가 높은 다공성 막 또는 다른 물질은 공지 방법으로 트롬빈 또는 다른 혈전 형성 또는 트롬빈 유사 효소로 유도될 수 있다. 유도된 막은 주사기와 도포기 니들 사이에 고정된다.

<159> 별개이지만 관련이 있는 일 실시 태양에서는, 유리면, 나일론면 또는 콜라겐 스폰지 또는 다른

물질을 응고를 개시하는 것으로 알려진 혈소판의 외전(外轉)을 일으키기 위하여 유사한 배열로 사용될 수 있다.

<160> 별개이지만 관련이 있는 실시 태양에서는, 겔화를 방지하기 위하여 농축 혈장을 차가운 상태로 유지시킬 수 있다. 도포 후, 살아있는 조직을 가열하면 겔화를 개시할 것이다.

<161> 선행 침전법이 가지고 있는 큰 문제점은 피브리노겐을 재구성시켜야 한다는데 있다. 이는 어려우며, 수 시간이 소요될 수 있고, 단지 비교적 저농도만을 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명은 보다 신속한 유용성을 허용할 뿐만 아니라, 외과의는 "이 환자는 출혈 소지자이다"라고 결정할 수 있고, 15 분내에 봉합제를 사용한다. 선행 기술은 수술 개시전에 외과의가 피브린 글루를 지시할 것을 요구한다.

<162> 본 발명의 농축된 혈소판이 풍부한 혈장은 자발적인 겔화 없이도, 필요에 따라서는 수 시간동안 필요할 때까지 장치내에 방치될 수 있다.

<163> 기타의 자가 침전법은 시간을 가지고 가공할 시간이 있도록 혈액을 미리 채집할 것을 요구한다. 이 방법은 불편하지만 에러를 추적할 수 있도록 하고, 따라서 감염을 허용한다.

<164> 통상적으로, 아프로티닌과 같은 단백질 가수분해 억제제를 피브린 글루의 피브리노겐 성분에 첨가한다(학계는 이것이 필요한가에 관하여 실제적으로 의견이 엇갈리고 있으며, 필요성이 엄밀하게 입증된 적은 없다). 농축된 PRP를 제조하는 본 방법은 침전 단계가 분명히 분실된 천연 억제제를 보유한다.

<165> 신선한 혈장으로부터 취한 피브리노겐은 (침전에 의해 손상된 단백질의 일반적 특성을 기준으로 하여) 기계적으로 우수한 겔을 제조한다. (본 혈장 농축물중에 포함된) 혈소판은 상처 치유에 유용하다 (다수의 참고문헌이 입수가능하다). 따라서, 본 발명의 기술의 장점은 혈소판을 포함하지 않는, 종래의 피브린 글루보다 우수한 상처 치유를 제공한다는 것이다.

<166> 외과의, 특히 미국의 외과의는 본 조직 봉합제를 "활성화"시키기 위하여 소의 트롬빈을 사용하려고 한다. 이는 소의 트롬빈이 입수가능하고, 외과학에서 일상적으로 사용하기 때문에 조절 문제는 아니다. 그러나, 본 발명은 농축된 혈소판이 풍부한 혈장에 존재하는 프로트롬빈을 활성화시키고(거나) 혈소판을 파괴하여 농축 혈장중의 1 가지 이상의 성분에 의해 응혈이 개시되도록 하는 배분자를 제공한다.

<167> 본 조직 봉합제 및 자기 조직의 봉합제는 상처를 단순히 봉합하고, 손상된 구조를 접착시키는 이상의 작용을 한다. 특히, 본 발명의 자기 조직의 봉합제는 환자 자신의 살아있는 전구 및 상처 치유 인자를 포함하고, 따라서, 치유 과정을 양육한다. 본 조직 봉합제의 다른 장점은 (i) 손상된 조직에의 접착을 향상시키고, (ii) 세포 침투를 촉진시키는 부착 인자의 존재를 포함한다는 것이다 환자 자신의 혈액으로부터 제조된 본 발명의 자기 조직의 봉합제에서 중요한 장점은 제법의 용이성, 신속성 및 편리함을 포함한다는 것이다 (이것은 사용 전에 즉시 작업실에서 제조할 수 있다). 더우기, 본 발명의 자기 조직의 봉합제 중에 소의 트롬빈이 임의적 부재는 면역계 및 이물 반응을 회피하고, 질병 유전 (즉, 소의 트롬빈원으로부터)을 경감시킨다.

<168> I. 현탁액으로부터 입자를 분리하는 분리기 및 분리 방법

<169> 본 발명의 또다른 특징은, 현탁액으로부터 입자를 분리하는 분리기 및 분리하기 위한 일반적인 방법이다. 생물학적 유체(혈액 및 혈장)으로부터 입자를 분리하는 것은 실험실에서 흔히 접하게 되는 일이다. 분리 챔버(즉, 본 발명의 농축 혈장을 제조하는데 사용되는 장치 중의 제1 챔버)를 포함하는 일회용 카트리지는 세포 및 고밀도 입자 분리(원심 분리력에 반응하여 이동하는 것)를 가능하게 한다.

<170> 따라서, 액체 현탁액으로부터 입자를 분리하기 위한 본 발명의 장치는,

<171> 유입구,

<172> 액체 현탁액으로부터 입자를 분리하는 제1 분리기를 포함하고 무입자 액체를 형성하며, 유입구와 유체 전달이 가능한 제1 챔버, 및

<173> 액체를 배출하는 유출구

<174> 로 이루어진다.

<175> "무입자 액체"는 불용성 입자, 특히 평균 입자가 미리 지정된 수치 (예: 500 내지 20 μ, 또는 필터 또는 다른 장치가 이러한 불용성 입자를 제거하는데 이용될 수 있는 수치; 예: 250μ, 100 μ, 80 μ, 50μ 등)보다 큰 불용성 입자가 실질적으로 없는 것이다.

<176> J. 거대 분자 용액을 농축하기 위한 농축제 및 농축 방법

<177> 본 발명의 또다른 특징은, 본 발명의 농축 혈장을 제조하는 장치에 사용된 농축제 (또는 제2) 챔버에 대한 고안을 기초로 하여 거대 분자 용액을 농축하기 위한 농축제 및 농축 방법이다. 예를 들면, 세파덱스(상품명, 파마시아사)는 거대 분자 용액을 농축하는데는 거의 사용되지 않는다. 이 장치는 건조 상태까지 농축할 수 없지만, 단백질(또는 고분자량 용액)을 농축하는 데는 장치 중의 농축제 챔버의 갯수에 따라 바람직하게는 3 배 또는 3 배의 배수 정도가 유용하다.

<178> 따라서, 소정의 수치보다 더 큰 분자량을 갖는 물질의 용액(거대 분자 용액)을 농축하기 위한 본 발명의 장치는,

<179> 유입구,

<180> 용액을 농축하기 위한 농축제 및 농축제로부터 용액을 분리하기 위한 분리기를 포함하며 유입구와 유체 전달이 가능한 챔버, 및

<181> 농축된 용액을 배출하기 위한 유출구

<182> 로 이루어진다.

<183> 본 발명의 다른 특징은 하기 실시 태양에서 분명해지며, 이는 본 발명의 설명으로 본 발명을 한정하지 않는다.

<184> 실시예 1

<185> 도 1, 2, 3 또는 4에 도시된 카트리지를 사용하여 하기 단계를 수행하고, 농축된 혈소판이 풍부한 혈장 및 조직 봉합제를 제조할 수 있다.

<186> I. 표준 시트레이트 항응고제를 사용하여 환자로부터 혈액을 수집한다.

<187> II. 표준양의 혈액(예: 50 cc)을 일회용 카트리지의 혈액 주입 포트로 주입한다. 카트리지는 오염되지 않도록 봉한다. 트랙킹 에러가 생기지 않도록 작동실에서 사용되어야 한다.

<188> III. 이어서 작동자가 마이크로프로세서로 제어되는 원심 분리기의 단추를 누름으로써 시작한다. 농축물이 제거되기 전까지 나머지 단계는 자동이다.

<189> IV. (유리 농축제 비드 혼입을 위한 임의의 단계, 도 2) 농축제 컵 립 외부로 유리 덱스트라노머 비드를 분산시키기에 충분한 속도로 원심 분리기를 신속히 시계 방향으로 회전시키고, 이어서 반시계 방향으로 수회 회전 시킨다.

<190> V. 원심 분리기를 3000 rpm 속도로 1 내지 10분 동안 자전 운동시켜 세포로부터 혈소판이 풍부한 혈장을 분리시킨다. 전혈을 혈액 수용 챔버에서 기공을 통해 분리 챔버로 주입시킨다.

<191> VI. 원심 분리기를 15 내지 90 초 동안 중지시킨다. 중력 하에 혈소판이 풍부한 혈장을 하위 챔버 또는 농축제 챔버로 통과시킨다(임의로 친수성 필터를 통과시킴으로써 도 2에 도시된 바와 같이 농축제 챔버에 유리 비드가 존재하는 경우 적절함).

<192> VII. 농축제 챔버에서 혈소판이 풍부한 혈장을 개방 세포 발포체와 정전기력으로 결합된 비드(도 1 및 3의 카트리지), 유리 농축제 비드(도 2 의 카트리지), 또는 디스크상에 융기된 비드(도 4의 카트리지)와 접촉시킨다. 원심 분리기를 천천히 회전시켜 혼합시킨다. 다공성 격벽의 다공성 및 소수성으로 발생된 낮은 원심 분리력은 표면 장력을 극복하게에 충분하지 못하고, 혈장은 내부 공간의 구획내에 남아있게 한다.

<193> 비드를 물, 이온 및 저분자량 단백질(예: 임계값 이하의 분자량을 갖는 단백질)로 팽창시킨다. 비드의 기공 크기는 단백질이 비드 주변 공간에서 농축될 수 있는 것으로 선택한다. 비드의 양은 혈소판이 풍부한 혈장이 소정량으로 농축되도록 선택한다(예: 3 배). 데브리산을 사용하는 경우, 혈장 10 cc당 약 2.6 g으로 3 배 농축시킨다. 단백질 농축물은 농축되지 않은 혈장과 같이 이온 농축물을 함유한다.

<194> VIII. 농축된 혈소판이 풍부한 혈장을 필터로 통과시켜 외부 구획으로 들어가도록 회전 속도를 증가시킨다.

<195> IX. 원심 분리를 중단시키고, 중력 하에 농축된 혈소판이 풍부한 혈장을 바닥에서 수집한다. 농축된 혈소판이 풍부한 혈장을 자발적인 겔화없이 수 시간 동안 더 방치할 수 있다.

<196> X. 농축된 혈소판이 풍부한 혈장을 주사기로 꺼낸다.

<197> XI. (임의의 단계) 트롬빈/칼슘 용액을 따로 제조한다.

<198> XII. 저온 침전된 피브리노겐에 관한 문헌에서 기재된 다양한 방법을 사용하여 두개의 용액을 혼합하고 신속한 겔화로 조직 봉합제를 형성한다.

<199> XIII. (임의의 단계; XI 및 XII으로 치환됨) 혈소판을 파괴시킬 수 있도록 만들어진 니들 팁을 사용하여 단일 성분 농축물을 소의 트롬빈없이 사용할 수 있다.

<200> 본 발명의 조직 봉합제와 저온 침전된 피브린으로부터 제조된 종래의 조직 봉합제의 특성을 비교하여 하기 표에 기재하였다.

<201> 표: 조직 봉합제 조성물의 농도

혈액 성분	침전된 피브린 글루	자기 조직의 농축된 혈소판이 풍부한 혈장 (3 배)
이온	재생 용액 당	환자의 혈장과 동일
혈소판		3 배의 혈장 농축
단백질	저온 침전된 단백질만; 피브리노겐, 인자 XIII, 피브로넥틴, 알부민, 플라스미노겐	모든 혈장 단백질은 정상(5 kDa 이하) 또는 3 배로 농축(5 kDa 이상)
알부민	10-25 mg/ml	100-165 mg/ml
인자 XIII	75 ㎍/ml	30-60 ㎍/ml
피브리노겐	70-110 mg/ml	5-14 mg/ml
피브로넥틴	2-9 mg/ml	0.5-1.2 mg/ml
플라스미노겐	20-60 ㎍/ml	600 ㎍/ml
아프로티닌	1500 KIU/ml	0 KIU/ml

<203> 또한, 본 발명의 조직 봉합제의 인장 강도는 저온 침전 피브린 조직 봉합제의 것과 유사하게 나타난다. 본 발명의 조직 봉합제에 의한 부착 강도는 피브리노겐 및 다른 중요한 단백질이 본 발명의 방법으로 변성되지 않으므로 저온 침전된 피브린의 것보다 월등하다고 믿어진다.

<204> 본 발명의 중요한 장점은 혈소판의 존재이다. 혈소판의 콜라겐 III 피브린에 대한 결합은 혈소판 응고을 가져오고, 5-히드록시트립타민 및 혈소판으로부터 방출되는 에피네프린에 의해 증진된다. 다른 성장 및 치유 인자는 혈소판에 의해 방출된다. 혈소판 유도적 성장 인자는 섬유 아세포 및 평활근 세포를 위한 미토겐이다. 혈소판 인자는 신생혈관화를 촉진하고, 특히 그 영역이 무산소 환경인 경우 그러하다.

<205> 또한, 혈소판은 피브린을 기계적 절단력 및 피브린 용해 작용에 저항력을 갖게한다. 특정 용도를 위해서는 되도록 적은 수의 혈소판이 바람직할 수 있다. 본 발명은 이러한 결과를 얻을 수 있도록 조절될 수 있다. 다른 혈액 세포에 비해 그들의 낮은 질량 때문에, 전혈로부터 상기의 큰 질량 세포 집단을 최소한으로 분리해내기 위한 조건에서 많은 혈소판이 최종 생산물로 남게된다. 예를 들어, 도 2에서 소결된 플라스틱 벽을 갖춘 4 인치 직경, 1인치 높이의 카트리지는 2000 rpm에서 3 분 동안 원심 분리로 대부분의 혈액 세포를 전혈 50 cc로부터 분리시킬 수 있다. 5000 rpm의 속도 증가 및 15 분의 시간으로 연장하여, 대부분의 혈소판은 또한 다공성 벽을 통해 가라앉아 혈소판 결핍된 혈장을 형성한다. 이러한 혈소판 결핍된 혈장은 혈장 또는 농축 유도된 혈장을 멸균 서브미크론 막을 통해 여과시켜 수 일간 저장하기에 적합한 최종 생성물로 가공하는 것이 바람직할 수 있다.

<206> 상기 기술적 측면에 있어서, 분명히 본 발명의 수많은 변형 및 변화가 가능하다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허 청구의 범위 내에서 본 명세서에 지지되는 한 달리 실행될 수도 있는 것으로 이해되어야 한다.

45. DelRossi, A.J., A.C. Cernaianu, R.A. Vertrees, C.J. Wacker, S.J. Fuller, J.Cilley Jr., W.A. Baldinc. "Platelet-rich plasma reduces postperative blood loss after cardiopulmonary bypass." J.Thorac Cardiovasc Surg 100(2) 1990: 281-6.

(57) 청구의 범위

청구항 1

변성된 피브리노겐을 함유하지 않고 활성인 피브리노겐을 함유하는, 조직 봉합제 또는 접착제용 혈장 농축물.

청구항 2

제1항에 있어서, 5 내지 400 mg/㎖의 피브리노겐을 함유하는 혈장 농축물.

청구항 3

제2항에 있어서, 혈소판, 0.5 내지 35 mg/㎖의 피브로넥틴, 및 물 및 생리학적으로 허용되는 무기 및 유기 이온을 생리학적 허용 농도로 함유하는 생리학적으로 허용되는 담체를 추가로 함유하는 혈장

농축물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 혈장 농축물 중에 상기 혈소판이 전혈로부터 얻은 농축되지 않은 혈장 중의 혈소판 농도에 비하여 적어도 1.5 배 농도로 존재하는, 상기 전혈로부터 제조된 혈장 농축물.

청구항 5

제4항에 있어서, 항생제, 콜라겐 플리스, 콜라게나제, 히알우론산, 상처 치료 인자, 상기 혈장의 응고 시간을 감소시키기에 유효한 양의 아연 이온, 및 생물학적으로 허용되는 염료로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 추가로 함유하는 혈장 농축물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 혈장 농축물을 조직에 적용하는 동안 육안으로 검출하기에 충분한 양의 디술파인 블루를 추가로 함유하는 혈장 농축물.

청구항 7

제3항에 있어서, 제약학적 활성 화합물을 추가로 함유하는 혈장 농축물.

청구항 8

(a) 전혈로부터 혈장을 분리시키는 단계, 및

(b) 피브리노겐을 크게 변성시키지 않는 농축제로 상기 혈장으로부터 물을 제거하여 농축된 혈장을 제공하는 단계

를 포함하는, 조직 봉합제 또는 접착제용 농축된 혈장의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 농축제가 물을 흡수하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 농축제가 덱스트라노머, 덱스트라민, 폴리아크릴아미드, 실리카겔, 제올라이트, 가교된 아가로즈, 전분 및 알기네이트겔로 이루어지는 군으로부터 선택되는 물질인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 농축제가 유리된 비드 형태 또는 표면에 부착된 형태인 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 농축제가 막을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 농축제로부터 상기 농축된 혈장을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 분리 단계 (a)가 상기 전혈을 원심력을 가하지 않은 상태에서 적혈구 및 백혈구의 통과를 방해하는 분리기와 원심적으로 접촉시키는 단계, 및 상기 전혈 중의 적혈구 및 백혈구가 상기 분리기를 통과하기에 유효한 원심력을 가하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 분리기가 매트, 발포체 또는 다공성 플라스틱 애뉼러스(annulus)인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 분리 단계 (a)가 원심력을 가하지 않은 상태에서 중력에 의해 적혈구 및 백혈구가 배출되지 않도록 성형 및 배치된 챔버 안으로 상기 전혈을 원심적으로 가라앉히는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 전혈 및 상기 혈장이 각각 (i) 혈소판, (ii) 고분자량 화합물, 또는 (iii) 혈소판과 고분자량 화합물을 함유하는 것인 방법.

청구항 18

제13항에 있어서, 상기 농축제가 유리된 비드 형태 또는 표면에 부착된 형태의, 덱스트라노머, 덱스트라민, 폴리아크릴아미드, 실리카겔, 제올라이트, 가교된 아가로즈, 전분 및 알기네이트겔로 이루어지는 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 물질이 매트릭스에 부착되어 있고, 상기 매트릭스는 매트, 발포체 또는

디스크를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, 상기 혈액이 혈액의 응고를 억제하기에 유효한 양의 응고 억제제를 추가 함유하는 것인 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 유입구, 상기 혈장을 상기 전혈로부터 분리시키기 위한 제 1 분리기를 포함하는 제 1 챔버, 상기 농축제와 상기 농축된 혈장을 상기 농축제로부터 분리시키기 위한 제 2 분리기를 포함하는 제 2 챔버, 및 상기 농축된 혈장을 배출시키기 위한 유출구를 갖는 밀봉된 카트리지 안에서 수행하는 방법.

청구항 22

제13항에 있어서, 상기 농축제로부터 농축된 혈장을 분리하는 단계 후에, 상기 제거 단계 및 상기 농축제로부터 농축된 혈장을 분리하는 단계를 반복하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

혈장을 전혈로부터 분리시키기 위한 원심 분리기, 및

피브리노겐을 크게 변성시키지 않고 상기 혈장으로부터 물을 제거하여 농축된 혈장을 제공하기 위한, 상기 원심 분리기와 유체 전달이 가능한 농축제

를 포함하는, 조직 봉합제 또는 접착제로 사용하기 위한 혈장 농축용 일회용 카트리지를 갖는 장치.

청구항 24

제23항에 있어서, 혈장을 전혈로부터 분리시키기 위한 원심 분리기를 포함하는 제 1 챔버, 및 상기 제 1 챔버와 유체 전달이 가능한 제 2 챔버를 포함하고, 상기 제 2 챔버는 피브리노겐을 크게 변성시키지 않고 상기 혈장으로부터 물을 제거하여 상기 혈장을 농축시키는 농축제 및 상기 농축제로부터 농축된 혈장을 분리하는 제 2 분리기를 포함하는 것인 장치.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 농축제가 덱스트라노머, 덱스트라민, 폴리아크릴아미드, 실리카겔, 제올라이트, 가교된 아가로즈, 전분 및 알기네이트겔로 이루어지는 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 장치.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 농축제가 유리된 비드 형태 또는 표면에 부착된 형태인 장치.

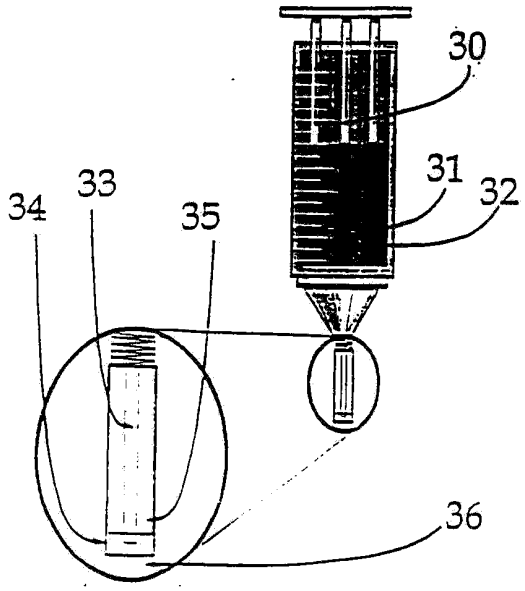
청구항 27

제24항에 있어서, 상기 농축제가 막을 포함하는 것인 장치.

요약

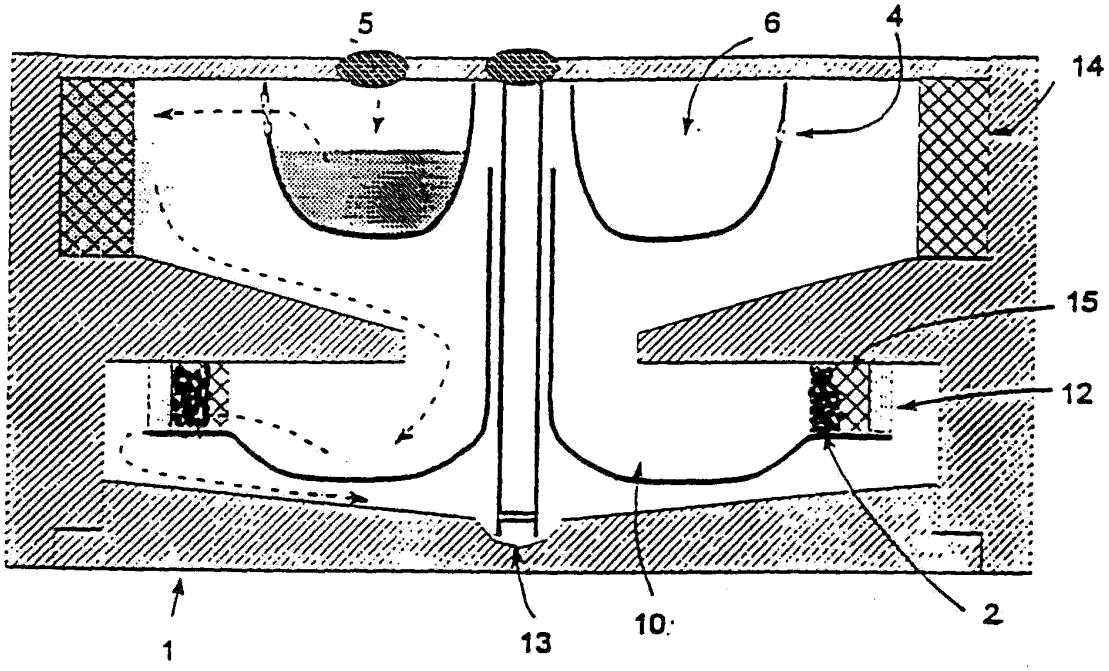
도면에 기재된, 조직 봉합제의 제조를 위한 저렴한 장치가 기재되어 있다. 이 장치는 자기 조직의 조직 봉합제를 제조하는데에 특히 적합하다. 혈소판 풍부 혈장 농축물을 칼슘과 트롬빈의 용액과 혼합한 직후에 조직 봉합제를 도포하는 조직 봉합 방법도 기재되어 있다. 부착 및 인장 강도는 침전법으로 제조된 채취된 혈액 피브린 봉합제에 필적하거나 또는 더 우수하다. 조직 봉합제는 환자의 혈액으로부터 얻어지는 고농도의 천연 피브린 용해 억제제를 함유하기 때문에, 피브린 용해 억제제가 필요하지 않다. 조직 봉합제는 또한 환자의 혈소판, 및 상처 치료를 촉진시키는 시판 중인 피브린 봉합제에는 존재하지 않는 추가의 인자를 함유한다.

대표도

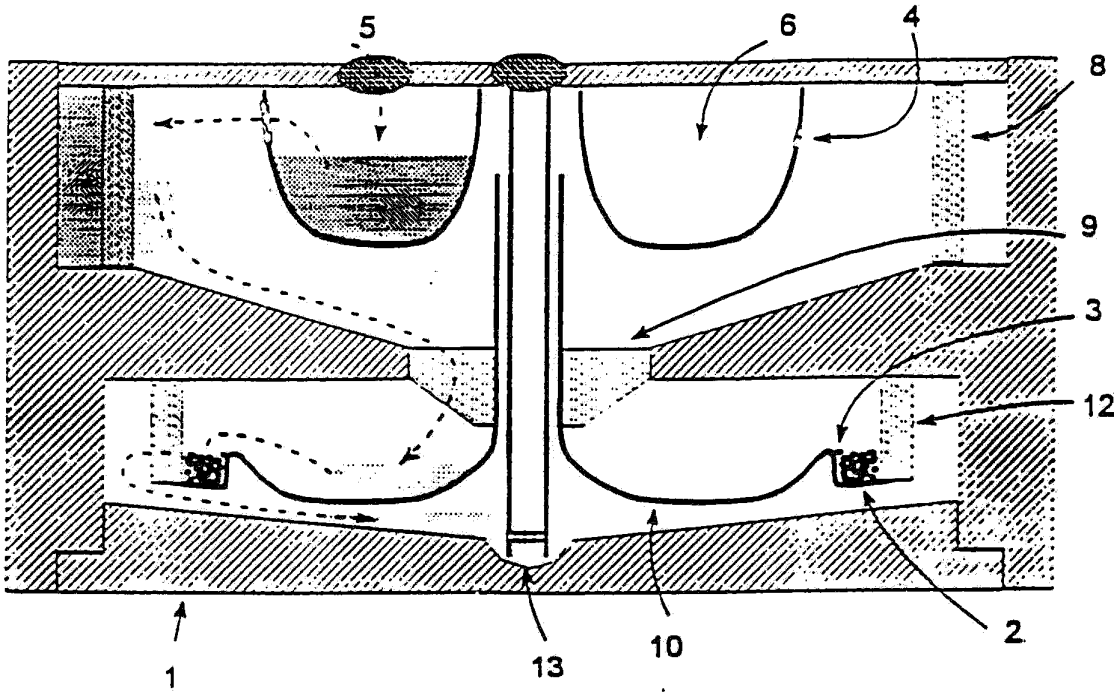


도면

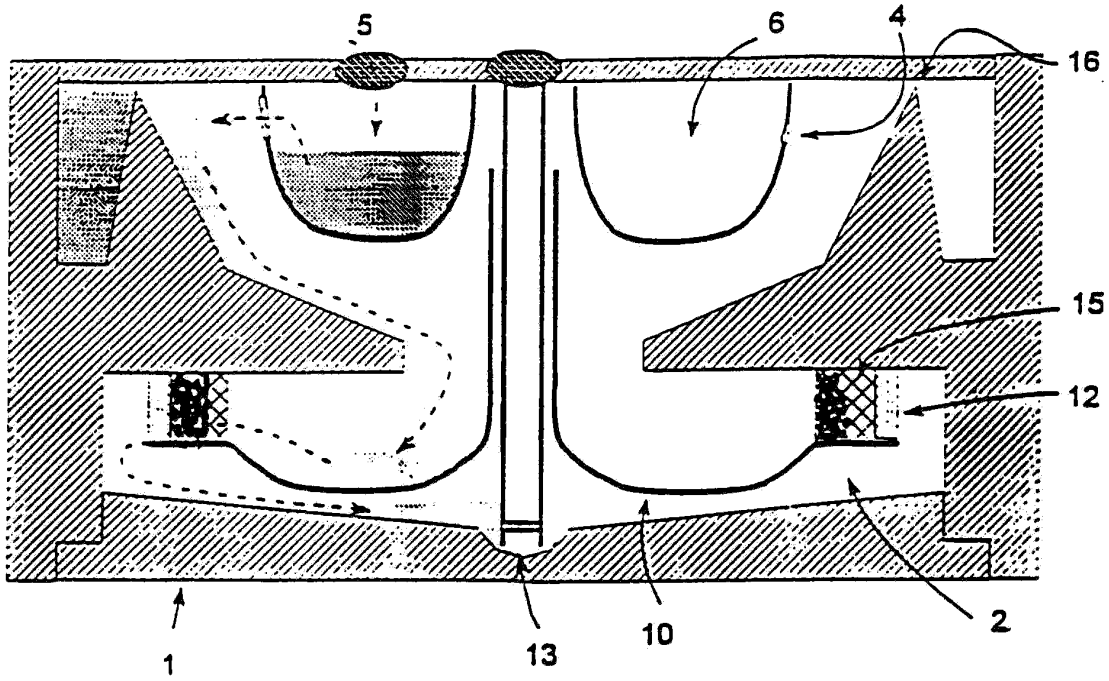
도면1



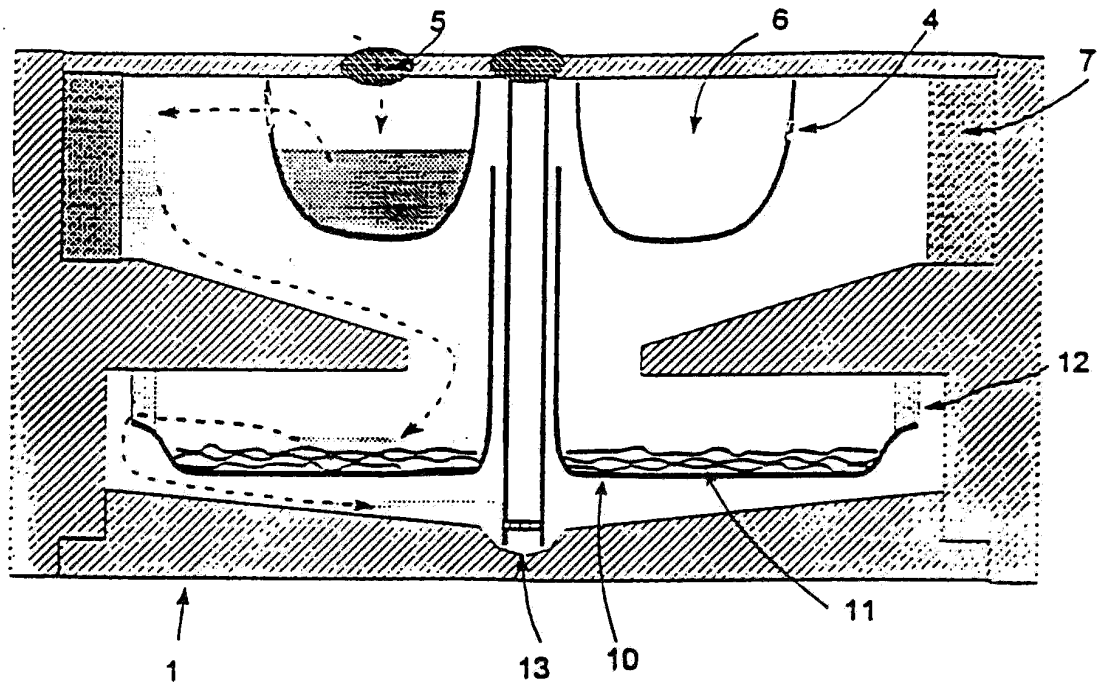
도면2



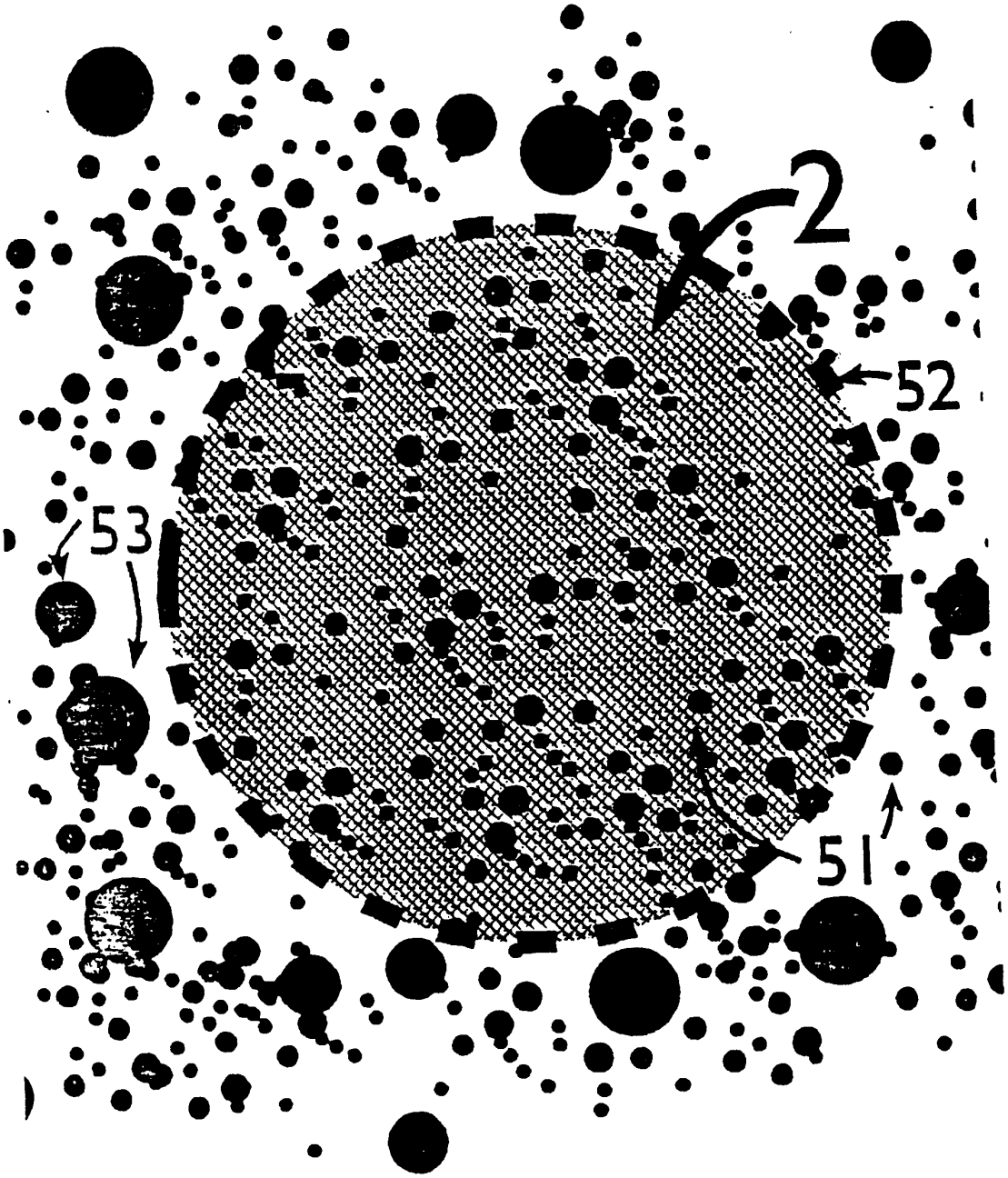
도면3



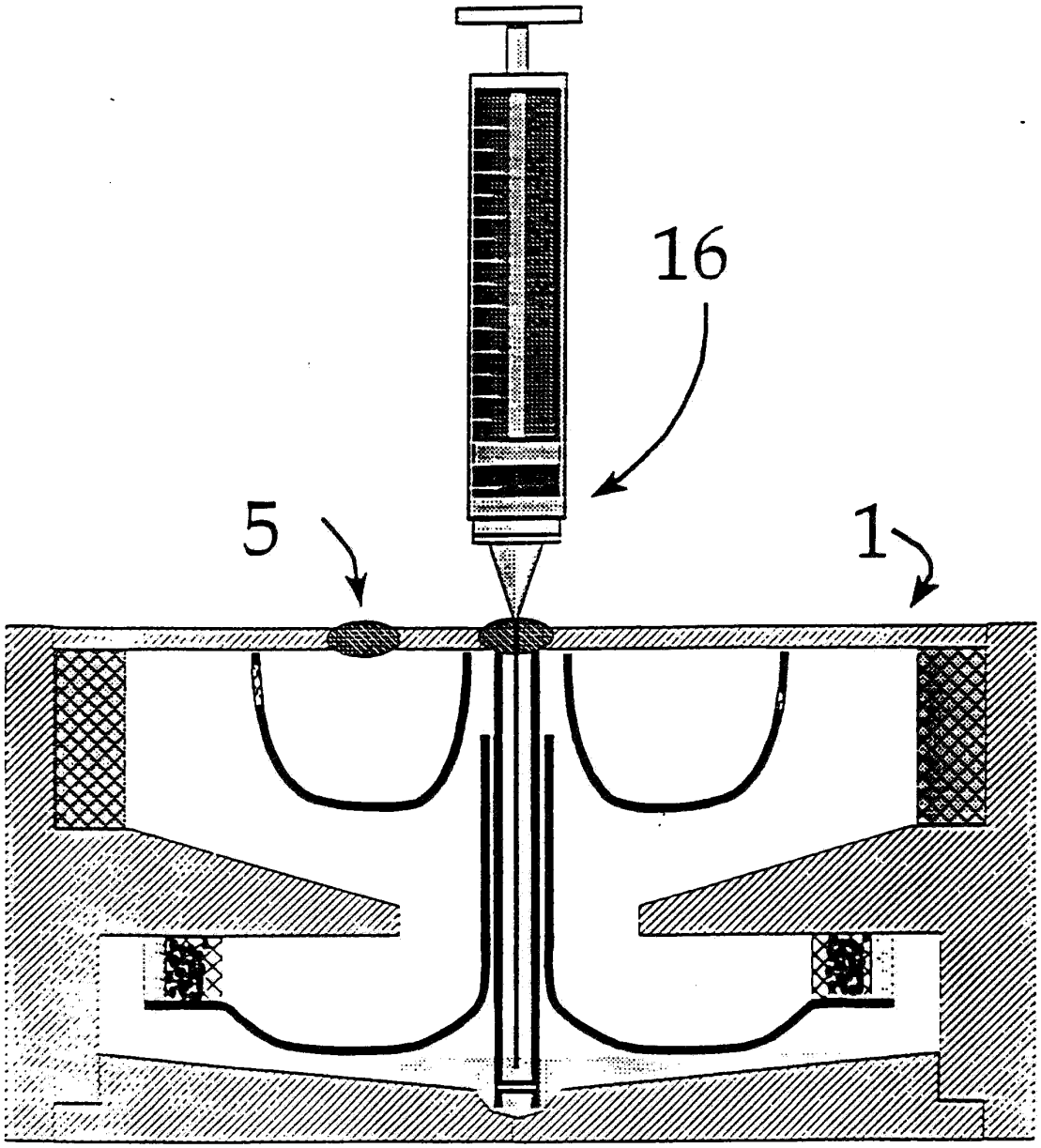
도면4



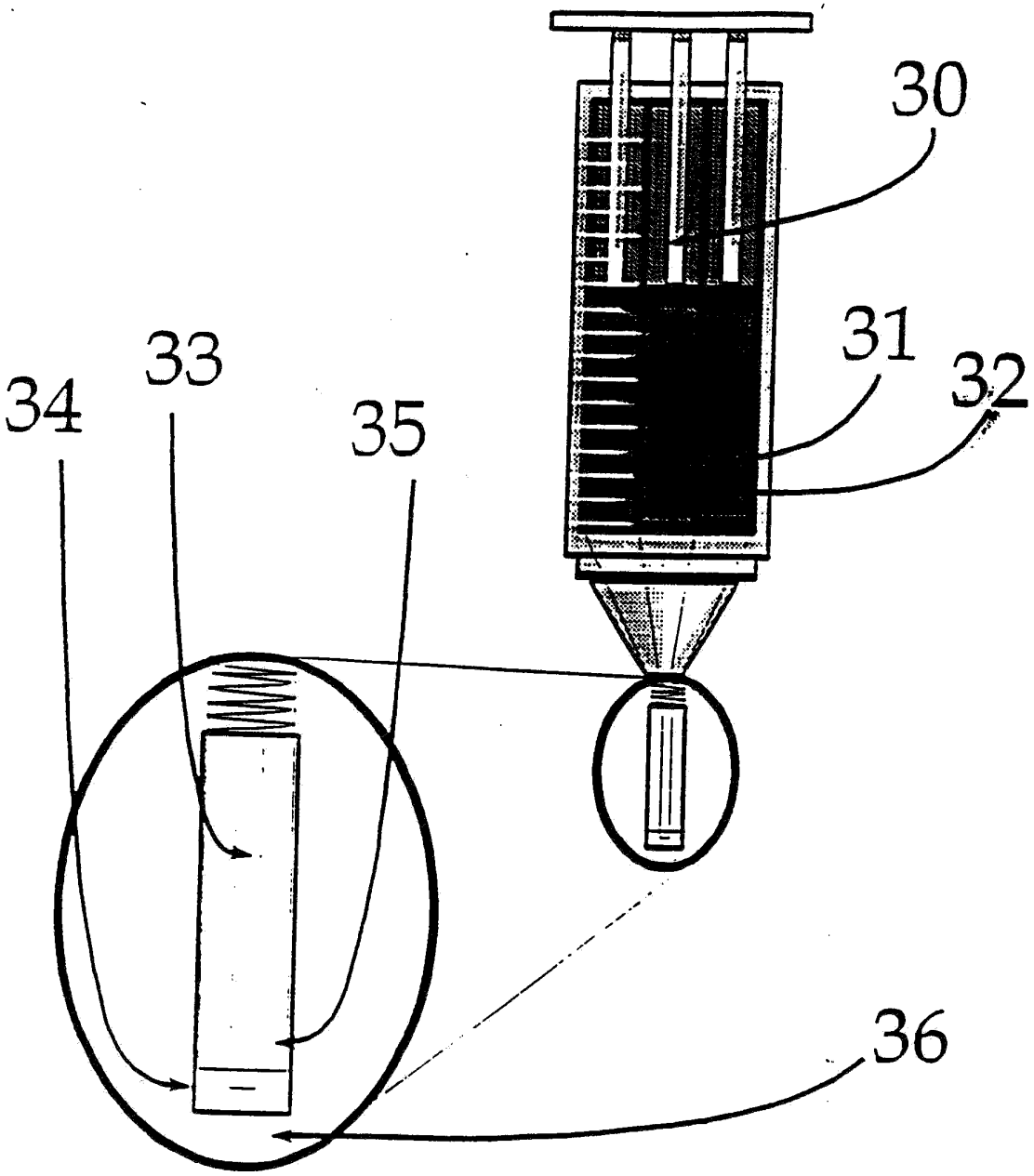
도면5



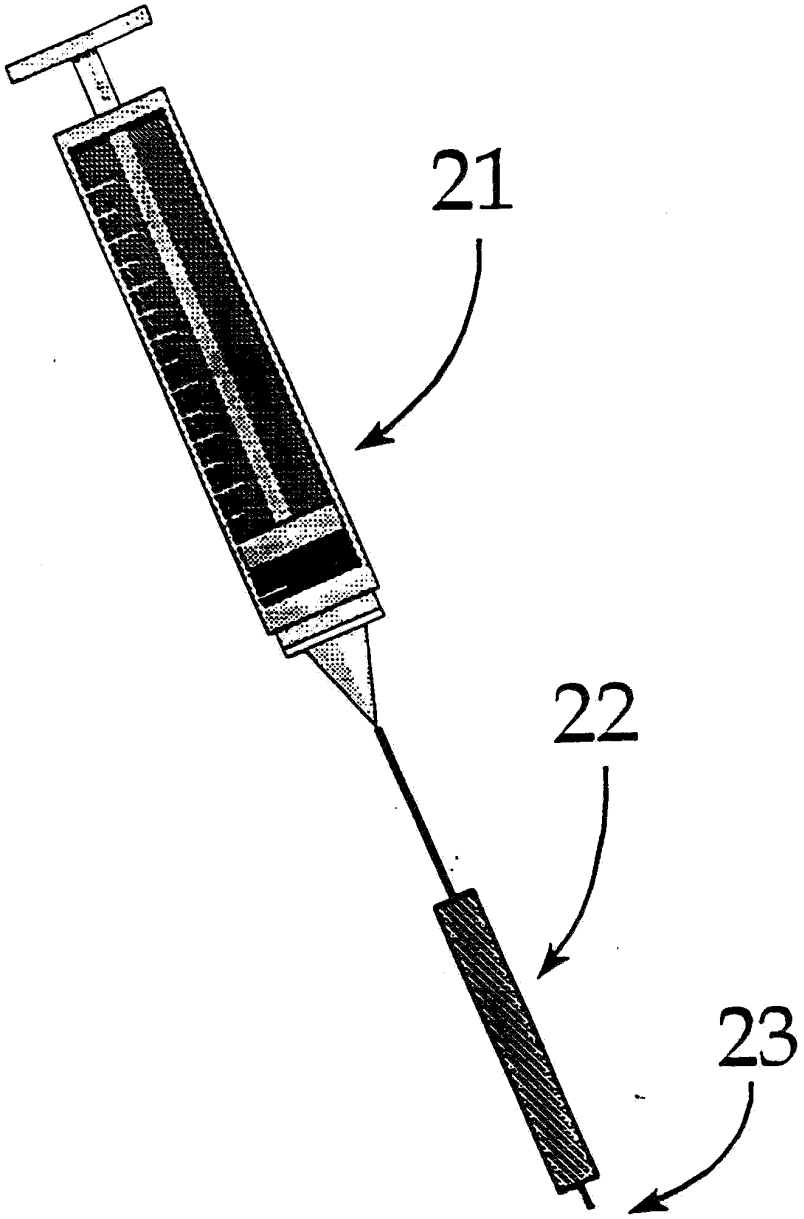
도면6



도면7



도면8



도면9

