(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0067267
(43) 공개일자 2019년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61L 27/18* (2006.01) *A61F 2/02* (2006.01)
*A61L 27/38* (2006.01) *A61L 27/40* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61L 27/18* (2013.01)
*A61F 2/02* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7016239(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년11월04일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-7031781
원출원일자(국제) 2009년11월04일
심사청구일자 2018년11월30일
(85) 번역문제출일자 2019년06월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/063306
(87) 국제공개번호 WO 2010/054013
국제공개일자 2010년05월14일
(30) 우선권주장
61/111,242 2008년11월04일 미국(US)
*(뒷면에 계속)*

(71) 출원인
**인리젠**
케이만군도 그랜드 케이만 케이와이1-1104 조지타운 사우스 처치 스트리트 어글랜드 하우스 피. 오. 박스 309
(72) 발명자
**러들로우, 존, 더블유.**
미국 27510-2536 노스캐롤라이나 카보로 리버크릭 플레이스 100
**제이요, 마누엘, 제이.**
미국 27104-1944 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 워윅 로드 2534
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**양영준, 김영**

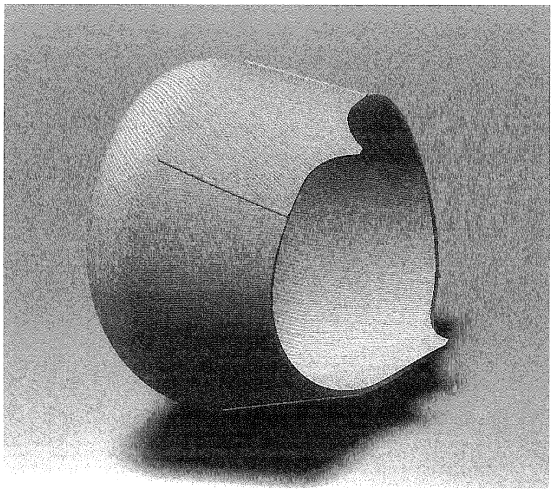
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **세포-지지체 구조물**

## (57) 요 약

본 발명은 지지체 및 해당 기관 또는 조직에서 유래한 것이 아닌 자가 세포를 사용한 기관 또는 조직 구조의 재생, 재건, 복구, 증대 또는 재배열에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61L 27/3804*** (2013.01)
***A61L 27/3826*** (2013.01)
***A61L 27/3882*** (2013.01)
***A61L 27/40*** (2013.01)
*A61L 2430/22* (2013.01)

(72) 발명자
**바수, 조이딥**
미국 27103 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 미카 코트 435
**버트램, 티모시, 에이.**
미국 27104-5060 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 토링턴 레인 423
**겐하이머, 크리스토퍼**
미국 27235 노스캐롤라이나 콜팩스 밸러드 팜 로드 4013
**구스리, 켈리, 아이.**
미국 27104 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 토레스비 코트 3415
**일라간, 로저**
미국 27215 노스캐롤라이나 벌링톤 신클레어 트레이스 2022
**자인, 디팍**
미국 27104-2640 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 선 크릭 드라이브 559
**나이트, 올루와토인**
미국 27127 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 헤더뷰 레인 3919
**페인, 리차드**
미국 27101-5135 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 프랭클린 스트리트 934
**퀸란, 사라, 에프.**
미국 27012 노스캐롤라이나 클레몬스 켄월트 드라이브 1521
**라포포트, 에이치., 스콧**
스페인 소펠라나 비즈카이아 아리아테라 에토르비데아 69 2디
**상하, 남라타**
미국 27104 노스캐롤라이나 윈스톤-살렘 스톤브룩 레인 320

(30) 우선권주장
61/113,542 2008년11월11일 미국(US)
61/114,021 2008년11월12일 미국(US)
61/114,388 2008년11월13일 미국(US)
61/114,382 2008년11월13일 미국(US)
61/201,555 2008년12월10일 미국(US)
61/201,550 2008년12월10일 미국(US)
61/201,554 2008년12월10일 미국(US)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

(a) 복벽부에 연결되도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관에 연결되도록 구성된 적어도 제1 측면 개구부를 갖는 관형 지지체를 포함하는 제1 이식형 생체적합성 구조물; 및

(b) 지지체의 표면 상에 또는 그 내에 침착된, 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 포함하는, 이식형 구조물의 용도.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자가 공급원으로부터 얻은 세포를 시딩한 지지체 (scaffold)를 사용하는, 얇은 막으로 조직화된 관강 (luminal) 기관 또는 조직 구조체의 재생, 재건, 복구, 증대 또는 대체에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 몇몇 이상증은 방광을 비정상적으로 발달시키고 수술적 증대를 필요로 할 수 있다. 후부 요도 판막, 양측성 이소성 수뇨관, 방광 외번 (extrophy), 총배설강 외번, 및 이분 척추 (즉, 척수수막류)와 같은 상태는 방광을 불유순성으로 만들 수 있고, 이것은 높은 압력을 생성시키는 소용적 방광을 형성시킨다. 임상적으로, 이것은 비뇨생식계의 높은 압력으로 인한 신부전증에 대한 위험을 증가시키면서 환자가 실금으로 고통받도록 한다. 이들 소아과 환자에 대한 현재의 표준 요법은 장관방광성형술을 통한 방광 증대이다 (문헌 [Lewis et al. Br. J. Urol. (1990); 65:488-491]). 방광 증대는 환자로부터 대장의 절편의 제거를 포함하고, 이어서, 유순성을 증가시키고, 압력을 감소시키고, 용적을 개선하기 위해 기존의 방광에 그 조직을 연결시킨다. 수술은 비교적 복잡하고 비용이 많이 소요된다. 기술적 결과가 양호한 환자의 경우에도, 절차는 수많은 즉각적인 위험 및 만성 합병증과 연관된다. 이들 수술의 침습성, 비용 및 합병증으로 인해 그들의 용도는 가장 중증의 방광 기능부전에만 제한된다. 유사한 수술 절차가 많은 경우에 방광암의 결과로서 방광 대체를 필요로 하는 성인에 대해 수행된다. 성인에서, 전체 방광을 절제하고 대장으로 대체한다. 유해 효과의 위험에도 불구하고, 미국에서 매년 약 10,000건의 절차가 수행되고, 이는 선천성 이상이 있는 아동에서 약 10% 및 방광암과 같은 후천성 질환이 있는 성인에서 90%를 포함한다. 현재의 표준 치료와 연관된 유해 효과를 제거하거나 적어도 실질적으로 감소시킬 개선된 방안에 대한 명백하게 강력한 의학적 필요가 존재한다.

[0003] 인간 방광은 소변에 대한 저장기로서 역할을 하는 골반강의 전방 부분에 위치하는 근육막성 낭이고, 이는 수뇨관으로부터 소변을 받아서 요도를 통해 배출한다. 인간에서, 방광은 골반뼈 (치골 결합) 뒤에서 골반 내에서 발견되고, 신체 외부로 나가는 요도로 불리는 배액관에 위로 및 후방으로 연결된다. 방광은 환자에서 방광의 악화를 일으키는 수많은 병 및 손상에 처하게 된다. 예를 들어, 방광 악화는 감염성 질병, 신생물 및 발달 이상으로 인해 일어날 수 있다. 추가로, 방광 악화는 또한 외상, 예를 들어 자동차 사고 및 운동 손상의 결과로서 일어날 수 있다. 방광암 환자에서 요로 전환술이 종종 필요하다. 미국에서 매년 54,000명이 넘는 새로운 방광암 사례가 발생한다. 대부분의 방광암은 상피 기원암이고, 세계적으로 매년 약 336,000명의 새로운 요로상피세포 암종 (이행 세포 암종 (TCC)) 사례가 발생한다 (문헌 [Kakizoe (2006) Cancer Sci. 97(9) 821]).

[0004] 요로 전환술은 개체가 손상된 또는 비-기능적 비뇨기계 때문에 소변을 볼 수 없을 때 신체로부터 소변을 전달하여 배설하는 방법이다. 일반적으로, 뇨의 흐름을 차단하고 수뇨관 및/또는 신장의 압력을 증가시키는 임의의 상태에서 요로 전환술이 필요할 수 있다. 전환술에 대한 몇몇 일반적인 적응증은 방광절제를 요하는 방광의 암, 신장 기능에 영향을 주는 신경성 방광, 방광에 대한 방사선 손상, 여성에서 일어나는 난치성 실금, 및 만성 골반 통증 증후군을 포함한다. 일반적으로, 요로 전환술을 위한 2가지 주요 전략, 즉, 수뇨관조루술 (urostomy) 및 비실금형 요로 전환술이 존재한다. 수뇨관조루술은 소장 점막하 조직 (SI)의 짧은 분절 (segment), 예컨대 회장, 결장 또는 공장과 같은 신체 내부의 도관 (conduit)에 연결되는, 복부 내의 스토마 (stoma)의 생성을 포함한다. 상기 절차에서, 짧은 SI의 다른 쪽 말단은 정상적으로 신장으로부터 방광으로 소변을 운반하는 수뇨관에 연결된다. 소변은 수뇨관을 통해 짧은 SI로 흘러 스토마 밖으로 나와 외부 수집 저장

기에 모인다. 상기 절차은 대안은 수뇨관을 스토마에 직접 부착하는 것이고, 이는 수뇨관루 조성술(ureterostomy)로도 불린다. 비실금형 요로 전환술은 위 또는 소장 또는 대장의 절편으로부터 신체 내부에 주머니 (pouch) 또는 저장기의 생성을 포함하고, 스토마의 사용을 필요할 수 있거나 필요하지 않을 수 있다. 예를 들어, 장 분절을 얻고 이를 보다 구 형상으로 변형함으로써 비실금형 피부 저장기를 생성할 수 있다. 변형된 분절의 한쪽 말단은 수뇨관에 연결되고, 다른 쪽 말단은 외부 수집 저장기로 이르는 스토마에 연결된다. 마지막으로, 동소 전환술은 한쪽 말단을 수뇨관에 다른 쪽 말단을 요도에 연결함으로써 재성형된 분절을 원래의 방광 대신에 놓음으로써 생성될 수 있고, 따라서 개체는 스토마를 통해서가 아니라 요도를 통해 소변을 볼 수 있다.

[0005] 소장 점막하 조직 (SI)이 요로 전환술을 위해 사용될 수 있지만, 점막 및 점막하층의 제거는 장 분절의 수축을 일으킬 수 있는 것으로 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Atala, A., J. Urol. 156:338 (1996)] 참조). 방광 수술을 위한 특정 위장관 분절의 사용에서 다른 문제, 예를 들어 결석 형성, 증가된 점액 생성, 신생물, 감염, 대사 장애, 장기간 구축 (contracture) 및 흡수가 보고되었다. 요로 전환술을 위한 천연 물질의 사용에서는 특이적인 근육 탄성 특성 및 요로상피 불투과성 기능을 가진 방광 조직이 쉽게 대체될 수 없는 것으로 나타났다. 또한, 요로 전환술을 위한 환자 자신의 장 분절의 사용에는 적어도 2가지 상이한 수술 절차가 요구되고, 여기서 제1 수술은 분절을 제거하기 위해 수행되고 제2 수술은 요로 전환술을 실시하기 위해 수행된다. 다수의 수술의 요건은 절차의 전체 비용, 환자에 대한 위험 및 환자의 전체 편의시설을 증가시킨다.

[0006] 따라서, 요로 전환술을 위한 위장관 분절의 사용과 연관된 다수의 합병증 및 다수의 수술 절차에 대한 요건 때문에, 요로전환 시스템을 그러한 시스템을 필요로 하는 환자에게 제공하기 위한 방법 및 장치가 필요하다.

[0007] 요실금은 큰 공동사회에서 및 보건 상황에서 모두 모든 연령 및 모든 신체 건강 수준의 사람에게 영향을 미치는 만연하는 문제이다. 의학적으로, 요실금은 환자를 요로 감염, 압박성 궤양, 회음부 발진 및 요로성 패혈증에 취약하게 한다. 사회적으로 및 심리적으로, 요실금은 곤란한 상황, 사회적 오명, 우울증, 및 특히 노인의 경우에 공공시설 수용 위험의 증가와 연관된다 (문헌 [Herzo et al., Ann. Rev. Gerontol. Geriatrics, 9:74 (1989)]). 경제적으로, 비용은 놀랄만한 수준이고; 미국에서만 매년 100억 달러를 넘는 비용이 실금 관리를 위해 소모된다.

[0008] 실금은 진성 소변 긴장 (방광 및 요도 과운동성), 내인성 괄약근 부전증 ("ISD"), 또는 둘 모두에 의해 발생할 수 있다. 이는 여성에게 특히 만연하고, 더 적은 정도로 실금은 아동 (특히, ISD) 및 근치적 전립선절제 후의 남성에 존재한다.

[0009] 복압성 실금은 복강 내압을 증가시키는 신체 활동, 예를 들어 기침, 재채기, 웃음 또는 운동 동안 일어나는 비자발적 소변 배설이다. 사람은 어느 한 종류 또는 두 종류 모두의 실금으로 고통받을 수 있고, 두 종류의 실금으로 고통받는 경우에 혼합 실금으로 불린다. 실금과 관련된 모든 지식에도 불구하고, 대부분의 절박성 실금 환자는 특발성이고, 이는 구체적인 원인을 확인할 수 없음을 의미한다. 절박성 실금은 어떠한 연령의 누구에게나 일어날 수 있고, 여성과 노인에게 보다 일반적이다.

[0010] 배뇨근은 방광으로부터 소변을 내보내도록 수축하는 방광 벽 근육이다. 배뇨근 기능장애, 예를 들어 반사항진의 결과는 불량한 방광 순응, 높은 방광내 압력, 및 방광 용적의 감소를 포함하고, 이들은 모두 상부 요로의 악화를 일으킬 수 있다.

[0011] 절박성 실금을 위한 현재의 치료법 중 하나는 신경독소, 예를 들어 보툴리눔 독소, 예를 들어, 보톡스 (Botox) (등록상표)의 주사이다. 보툴리눔 독소는 방광 벽의 배뇨근 근육을 마비시킴으로써 또는 가능하게는 방광에서 구심성 경로에 영향을 미치고 요로상피하 신경에서 감각 수용기를 감소시킴으로써 방광 과활동성에 대한 그의 효과를 발휘하는 것으로 생각된다. 보툴리눔 독소 분자의 큰 크기로 인해 확산하는 그의 능력이 제한되고, 따라서 구심성 및 원심성 신경 섬유 모두에 도달하지 못할 수 있다. 그 결과, 예를 들어, 과민성 방광 (OAB)에 대한 현재의 투여 방법에서는 방광 근육벽에 보툴리눔 독소의 많은 주사 (일반적으로 20 내지 50회)를 필요로 하고, 따라서 내원 횟수 및 연관된 치료 비용을 증가시킨다. 또한, 방광으로부터 감각 신경전달물질 방출 억제의 만성적인 장기간 영향의 안전성은 아직 결정되지 않았다.

[0012] 요실금의 추가의 치료 방안은 방광 이완 특성이 있는 약물의 투여를 포함하고, 여기서 항콜린성 의약이 그러한 주요 약물이다. 예를 들어, 항콜린제, 예를 들어 프로판텔린 브로마이드, 및 평활근 이완제/항콜린제의 조합물, 예를 들어 라세믹 옥시부티닌 및 디시클로민이 절박성 실금을 치료하기 위해 사용되어 왔다 (예를 들어, 문헌 [A. J. Wein, Urol. Clin. N. Am., 22:557 (1995)] 참조). 그러나, 종종, 상기 약물 요법은 모든

클래스의 실금 환자에서 완전한 성공에 도달하지 않고, 종종 환자는 심각한 부작용을 경험하게 된다.

[0013] 약물 요법 이외에, 본 발명 이전에 당업자가 사용한 다른 방법은 인공 괄약근의 사용 (문헌 [Lima S. V. C. et al., J. Urology, 156:622-624 (1996)], [Levesque P. E. et al., J. Urology, 156:625-628 (1996)]), 방광 경부 지지체 인공삽입물 (Kondo A. et al., J. Urology, 157:824-827 (1996)), 가교결합형 콜라겐의 주사 (문헌 [Berman C. J. et al., J. Urology, 157:122-124 (1997)], [Perez L. M. et al., J. Urology, 156:633-636 (1996)]; [Leonard M. P. et al., J. Urology, 156:637-640 (1996)]), 및 폴리테트라플루오로에틸렌의 주사 (문헌 [Perez L. M. et al., J. Urology, 156:633-636 (1996)])를 포함한다.

[0014] ISD와 연관된 요실금 치료를 위한 최근의 잘 알려진 방법은 환자를 요도주위 내시경 콜라겐 주사로 처리하는 것이다. 이것은 방광 누출 또는 복압성 실금의 가능성을 감소시키기 위해 방광 근육을 증대시킨다.

[0015] 실금을 회피하기 위한 현재의 해결책에는 잘 알려져 있는 단점이 있다. 방광 경부 둘레에 내시경으로 유도된 콜라겐 주사는 유의한 이환율이 없이 괄약근 부전증에서 꽤 높은 성공률을 갖지만, 콜라겐의 사용은 평균 2년 후에 실패가 일어날 수 있고, 그의 비용 효율성을 고려해야 한다 (문헌 [Khullar V. et al., British J. Obstetrics & Gynecology, 104:96-99 (1996)]). 또한, 아마도 이동 현상에 의한 환자 비실금의 악화 (문헌 [Perez L. M. et al.])로 인해 비실금을 복구하기 위해 반복 주사를 필요로 할 수 있다 (문헌 [Herschorn S. et al., J. Urology, 156:1305-1309 (1996)]).

[0016] 복압성 요실금의 치료를 위한 근치적 전립선절제 이후 콜라겐을 사용한 결과는 또한 일반적으로 실망스러웠다 (문헌 [Klutke C. G. et al., J. Urology, 156:1703-1706 (1996)]). 또한, 한 연구에서는 소 진피 콜라겐의 주사가 IgG 및 IgA 클래스의 특이적 항체를 생산시킨 증거를 제공한다 (문헌 [McCell, M. and Delustro, F., J. Urology 155, 2068-2073 (1996)]). 따라서, 시간 경과에 따라 콜라겐에 대한 가능한 환자 감작화가 예상될 수 있다.

[0017] 제한된 성공률에도 불구하고, 다른 적합한 대안의 부재로 인해 요도경유 콜라겐 주사 요법은 내인성 괄약근 부전증에 대한 허용되는 치료법으로 유지된다.

[0018] 현재, 의사는 과민성 방광 질환 또는 절박성 실금으로 고통받는 개체를 초기에 비-침습적인 제약 의학 제품을 사용하여 치료한다. 그러나, 이들 비-침습적인 제약 제품이 실패하면, 의사는 보다 침습적인 해결책을 제안한다.

[0019] 따라서, 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체, 예를 들어, 방광을 증대하는 최소 침습적인 방법이 필요하다.

[0020] 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체, 예를 들어 방광, 방광의 일부, 또는 방광 성분의 재건, 복구, 증대 또는 대체에 사용하기 위한 이식형 세포-시딩된 매트릭스를 성공적으로 제공하기 위해 조직 공학 원리가 적용되었다. 미국 특허 6,576,019 (Atala)에 기재된 바와 같이, 세포는 환자 자신의 조직, 예를 들어 방광, 요도, 수뇨관 및 다른 비뇨생식 조직으로부터 유래될 수 있다. 그러나, 새롭고 건강한 공학처리된 조직을 발달시키기 위한 기초 단위로서 1차 기관 부위로부터 세포 배양 시스템의 개발 및 유지에 대한 의존성과 연관된 도전과제가 남아있다. 예를 들어, 결함성 방광으로부터 방광 세포를 배양하면 배양된 세포가 또한 결함성일 것은 당연하기 때문에, 결함성 방광의 치료에서는 세포 공급에 관한 특정 도전과제가 존재한다. 그러한 세포는 이식형 네오(neo)-방광 지지체 또는 매트릭스에 거주시키기 위한 현명한 선택이 아니다. 따라서, 이식형 네오-기관/조직 구조체 지지체 또는 매트릭스 상에 시딩하기 위해 적합한 세포의 대안적인 공급원이 필요하다.

[0021] 인간 지방 조직이 성체 줄기 세포의 풍부한 공급원이라는 개념을 지지하는 많은 문헌이 존재한다 (문헌 [Devlin et al. (2004), Cytotherapy 6:7-14]; [Awad, et al. (2003), Tissue Engineering 9:1301-12]; [Erickson et al. (2002), Biochemical and Biophysical Research Communications 290:763-769]; [Gronthos et al. (2001), Journal of Cellular Physiology 189:54-63]; [Halvorsen et al. (2001); Metabolism 50:407-413]; [Halvorsen et al. (2001), Tissue Eng. 6:729-41]; [Harp et al. (2001), Biochemical and Biophysical Research Communication 281:907-912]; [Hicok et al. (2004), Tissue Engineering 10:371-380]; [Safford et al. (2002), Jun 7, 294(2):371-9]; [Safford et al., (2004), Experimental Neurology 187:319-28]; [Sen et al. (2004), Journal of Cellular Biochemistry 81:312-319]; [Sigal et al. (1994), Hepatology 19:999-1006]; [Wickham et al. (2003), Clinical Orthopedics and Related Research, 412:196-212]; [Ashijian et al. (2003), Plast Reconstr Surg. 111:1922-31]; [De Ugarte et al. (2003), Cells Tissues Organs. 174:101-9]; [Mizumo et al. (2002), Plast Reconstr Surg. 109:199-209]; [Morizono et al. (2003), Hum Gene

Ther. 14:59-66]; [Winter et al. (2003), Arthritis Rheum. 48:418-29]; [Zuk et al. (2001), Tissue Eng 7:211-228]; [Zuk et al. (2002), Mol Biol 13: 4279-4295] ([Gimble et al. (2003), Cytotherapy 5:362-369]에서 검토됨)). 지방 유래 성체 줄기 세포 (ADAS)로 불리는 이들 세포는 MSC에 대등한 면역표현형 및 분화 능을 보인다 (문헌 [Gronthos et al. (2001), Journal of Cellular Physiology 189:54-63]; [Safford et al. (2002), Biochem Biophys Res Commun. 294(2):371-9]; [Zuk et al. (2002), Mol Biol Cell 13:4279-4295]).

[0022] 인간 지방흡인 시료로부터 성체 줄기 세포를 단리하기 위한 재현가능하고 효율적인 방법은 공공 영역에서 이용 가능하다 (문헌 [Aust et al. (2004), Cytotherapy 6:7-14]; [Halvorsen et al. (2001), Metabolism 50:407-413]). 절차는 조직의 콜라게나제 소화, 분별 원심분리, 및 배양액 내의 팽창을 포함한다. 1 g의 조직은 배양 24시간 내에 50,000 내지 100,000개의 기질 (stromal) 세포를 생성시킬 수 있다 (문헌 [Sen et al. (2001), J Cellular Biochemistry 81:312-319]). 20명의 개체 공여자로부터 얻은 시료를 분석하면, 1 ml의 지방흡인 폐기물로부터 평균 94% 생활력을 가진 401,000개의 세포가 일관되게 회수되었다 (문헌 [Aust et al. (2004), Cytotherapy 6:7-14]). 이들 세포를 팽창시키면 표준 지방흡인물 (lipoaspirate)로부터 2주의 기간 내에 5억 개 초과의 세포의 집단을 생성할 수 있다.

[0023] 덱사메타손, 인슐린, 이소부틸메틸잔틴 및 티아졸리딘디온의 존재 하에, ADAS 세포는 지방생성을 겪는다 (문헌 [Sen et al. (2001) Journal of Cellular Biochemistry 81:312-319]). ADAS 세포의 분화능은 지방세포 계열에 제한되지 않는다. 연골세포 및 골모세포 경로를 따라 ADAS 세포 분화를 촉진하는 조건은 보고되었다 (문헌 [Awad, et al. (2003), Tissue Engineering 9:1301-12]; [Erickson et al. (2002), Biochemical and Biophysical Research Communications 290:763-769]; [Halvorson et al. (2001), Metabolism 50:407-413]; [Hicok et al. (2004), Tissue Engineering 10:371-380]; [Wickham et al. (2003), Clinic Orthopedics and Related Research 412:196-212]). 생체 내에서, 히드록시아파타이트 생체물질과 조합한 인간 ADAS 세포는 면역결핍 마우스에 피하 이식될 때 뼈모양 매트릭스를 합성한다 (문헌 [Hikok et al. (2004), Tissue Engineering 10:371-380]). 항산화제 및 다른 매개물질의 존재 하에 배양된 쥐 또는 인간 지방 유래 성체 줄기 세포 (각각 muADAS 및 huADAS)가 신경세포 분화와 일치하는 형태학 및 표현형 변화를 겪음을 입증하는 상당한 데이타가 이용가능하다 (문헌 [De Ugarte (2003) Cells Tissues Organs. 174:101-9]; [Safford et al. (2002), 294(2):371-9]; [Safford et al. (2004), Experimental Neurology 187:319-28]).

[0024] 문헌 [Jayo et al. Regen. Med. (2008) 3(5), 671-682] (이하에서 "제이요 (Jayo) I"로 언급함)에 기재된 바와 같이, 기관 또는 조직을 복구하기 위한 시도는 종종 콜라겐 침착 및 일부 경우에 흉터 조직 형성이 동반하는 불완전한 조직 대체를 특징으로 하였다. 제이요 등은 또한 조직 공학의 보다 바람직한 성과는 조직 구조체 또는 기관의 원래 구조 및 기능의 재생임을 관찰하였다. 또한, 문헌 [Jayo et al., J. Urol. (2008) 180;392-397] (이하에서 "제이요 II"로 언급함)을 참조한다. 특정 분자가 생체 내에서 재생 과정과 연관된 것으로 생각된다. 예를 들어, 케모카인 MCP-1은 단핵 세포를 동원하는 그의 능력에 대해 가장 잘 알려져 있다. 그러나, 이는 또한 혈관 평활근 세포 증식을 위한 강력한 유사분열촉진물질인 것으로 보인다. MCP-1은 혈관 손상 영역에 순환 단핵구를 동원하고, 이는 다시 대개 사이토킨 및 성장 인자에 대한 저장기로서 역할을 할 수 있는 대식세포로 전환된다. 대식세포는 또한 콜레스테롤을 먹고, 지질을 산화시킨다. 대식세포 및 근육 전구체 세포는 둘 모두 MCP-1 신호전달에 대한 표적인 것으로 생각된다. CCR-2 수용체는 MCP-1 (CCL2)에 대한 리간드이고, CCR-2 결핍 마우스는 지방생성/섬유증이 향상된 재생 결함을 보인다. CCR-2 결핍 마우스로부터의 절편은 골격근 재생으로 처리할 때 정상 마우스에 비해 보다 많은 간질 (interstitial) 공간, 많은 수의 염증성 세포, 크고 둥근 팽창된 근섬유, 간질 공간 내에 보다 많은 섬유모세포 축적, 지방 침착물 주변에 콜라겐 분포가 있는 지방 침윤, 및 칼슘 침착이 동반된 섬유증을 보였다 (문헌 [Warren et al. (2005), FASEB J.19:413-415]; [Selzman et al. (2002), Am J Physiol Heart Circ Physiol. 283(4);H1455-H1461]; [Shannon et al. (2007), Am. J. Cell Physiol. 292:C953-C967]; [Shireman et al. (2006), J. Surg. Res. 134(1):145-57. Epub 2006 Feb 20]; [Amann et al. (1998), Brit. J. Urol. 82:118-121]; [Schecter et al. (2004), J. Leukocyte Biol.75:1079-1085]; [Deonarine et al.,(2007), Transl Med. 5:11]; [Lumeng et al. (2007), J Clin. Invest. 117(1): 175-184]).

[0025] 본 발명은 본원에서 설명되는 재생, 재건, 복구, 증대 또는 대체의 대상인 기관 또는 조직 구조체와 상이한 자가 공급원으로부터 유래된 세포 집단, 상기 세포의 단리 방법, 상기 세포가 시딩된 네오-기관/조직 구조체 지지체 또는 매트릭스 (구조물) 및 그의 제조 방법, 및 상기 네오-기관/조직 구조체 구조물을 사용하는 그를 필요로 하는 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

## 발명의 내용

[0026] 발명의 개요

[0027] 본 발명은 대상체로부터 유래된 자가 세포가 시딩된 지지체를 사용하는, 그를 필요로 하는 대상체에서 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 재생, 재건, 복구, 증대 또는 대체에 관한 것이다.

[0028] 한 측면에서, 본 발명은 요로 전환 구조물 및 이의 제조 및 사용 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 요로 전환술은 대상체에서 결함성 방광에 대한 것이고, (a) 복벽부에 연결되도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관에 연결되도록 구성된 적어도 제1 측면 개구부를 갖는 관형 지지체를 포함하는 제1 이식형 생체적합성 구조물; 및 (b) 지지체의 표면 상에 또는 그 내에 침착된, 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 요로 전환술은 대상체에서 결함성 방광에 대한 것이고, (a) 대상체의 복벽 내의 개구부에 연결되도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관으로부터 관형 지지체의 내부로의 소변의 통과를 허용하도록 제1 수뇨관에 연결되기에 적합한 적어도 제1 측면 개구부를 포함하는, 소변의 일시 저장 및 통과를 위해 적합한 이식형 생체적합성 관형 지지체; 및 (b) 지지체의 표면 상에 또는 그 내에 침착된, 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 포함한다.

[0029] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 a) 복벽부에 접촉하도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관에 연결되도록 구성된 적어도 제1 측면 개구부를 갖는 관형 지지체를 포함하는 제1 이식형 생체적합성 지지체를 제공하는 단계; 및 b) 요로 전환 구조물을 형성하도록 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 지지체의 제1 영역 상에 또는 내에 침착시키는 단계를 포함하는, 그를 필요로 하는 대상체에서 결함성 방광에 대한 요로 전환 구조물을 제조하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 a) 대상체의 복벽 내의 개구부에 연결되도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관으로부터 관형 지지체의 내부로의 소변의 통과를 허용하도록 제1 수뇨관에 연결되기에 적합한 적어도 제1 측면 개구부를 포함하는, 소변의 일시 저장 및 통과를 위해 적합한 이식형 생체적합성 관형 지지체를 제공하는 단계; 및 b) 요로 전환 구조물을 형성하도록 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 지지체의 표면 상에 또는 그 내에 침착시키는 단계를 포함한다.

[0030] 하나의 다른 실시양태에서, 본 발명은 그를 필요로 하는 대상체에서 결함성 방광에 대한 요로 전환술을 제공하는 방법을 제공하고, 이 방법은 a) 복벽부에 연결되도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관에 연결되도록 구성된 적어도 제1 측면 개구부를 갖는 관형 지지체를 포함하는 제1 이식형 생체적합성 지지체를 제공하는 단계; b) 요로 전환 구조물을 형성하도록 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 지지체의 제1 영역 상에 또는 내에 침착시키는 단계; 및 c) 요로 전환술을 형성하기 위해 구조물을 대상체 내에 이식하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 a) 대상체의 복벽 내의 개구부에 연결되도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관으로부터 관형 지지체의 내부로의 소변의 통과를 허용하도록 제1 수뇨관에 연결되기에 적합한 적어도 제1 측면 개구부를 포함하는, 소변의 일시 저장 및 통과를 위해 적합한 이식형 생체적합성 관형 지지체를 제공하는 단계; b) 요로 전환 구조물을 형성하도록 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 지지체의 표면 상에 또는 그 내에 침착시키는 단계; 및 c) 요로 전환술을 형성하기 위해 구조물을 대상체 내에 이식하는 단계를 포함한다. 하나의 다른 실시양태에서, 방법은 (a) 복벽부에 접촉하도록 구성된 제1 말단, 제2 폐쇄 말단, 및 제1 수뇨관에 연결되도록 구성된 적어도 제1 측면 개구부를 갖는 관형 지지체; 및 (b) 요로 전환술의 형성을 위해 지지체의 표면 상에 또는 그 내에 침착된, 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 포함하는 요로 전환 구조물을 대상체 내에 이식하는 단계를 포함한다.

[0031] 모든 실시양태에서, 요로전환 지지체는 제2 수뇨관에 연결되도록 구성된 제2 측면 개구부를 추가로 포함할 수 있다. 모든 실시양태에서, 제1 말단은 복벽과 동일 평면으로 위치하도록 구성될 수 있다. 모든 실시양태에서, 제1 말단은 대상체의 피부에 봉합되도록 구성될 수 있다. 모든 실시양태에서, 제1 말단은 스토마를 형성하도록 구성될 수 있다. 모든 실시양태에서, 스토마는 스토마 버튼 (button)을 추가로 포함할 수 있다. 모든 실시양태에서, 지지체는 스토마를 형성하도록 구성된 와셔 고리 (washer ring)를 추가로 포함한다. 모든 실시양태에서, 생체적합성 지지체는 생분해성이다. 모든 실시양태에서, 지지체는 폴리글리콜산, 폴리락트산, 및 폴리글리콜산과 폴리락트산의 공중합체로 이루어지는 군 중에서 선택되는 물질을 포함할 수 있다. 모든 실시양태에서, 세포 집단은 평활근 세포 집단이다. 모든 실시양태에서, 전환술은 결함성 방광에 대한 대체 수단이다. 모든 실시양태에서, 전환술은 일시적일 수 있다. 모든 실시양태에서, 전환술은 영구적일 수 있다. 모든 실시양태에서, 관형 지지체는 직사각형 단면 입체형태 또는 삼각형 단면 입체형태, 또는 원형 단면 입체형태를 가질 수 있다. 모든 실시양태에서, 전환술에는 요로상피 세포가 사용되지 않을 수 있다. 모든 실시양태에서, 본 발명의 방법은 비뇨기-유사 조직 재생을 특징으로 하는 네오-요로관을 제공할 수 있다. 모든 실시양태에서, 재생된 조

직은 요로상피, 고유판, 및 평활근 다발 중의 하나 이상의 존재를 특징으로 할 수 있다. 모든 실시양태에서, 재생된 조직은 수뇨관-도관 접합부 (UCJ), 도관의 머리 부분, 및 도관의 중간 부분 중의 하나 이상에서 관찰될 수 있다. 모든 실시양태에서, 재생된 조직은 점막, 점막하층, 및 섬유혈관 기질이 존재하는 평활근 중의 하나 이상의 존재를 특징으로 할 수 있다. 모든 실시양태에서, 재생된 조직은 평활근이 그 밑에 있는 연속적인 요로상피이다. 모든 실시양태에서, 요로관은 이식시에 상피화 점막을 형성한다.

[0032] 한 측면에서, 본 발명은 단리된 평활근 세포 집단에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 말초 혈액으로부터 유도되고, 평활근 세포 마커에 양성인, 수축 기능을 갖는 하나 이상의 세포를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 지방 조직으로부터 유도되고, 평활근 세포 마커에 양성인, 수축 기능을 갖는 하나 이상의 세포를 함유한다.

[0033] 모든 실시양태에서, 세포 집단은 마이오카딘, 알파-평활근 액틴, 칼포닌, 미오신 중쇄, BAALC, 데스민, 근섬유모세포 항원, 및 SM22로부터 선택되는 하나 이상의 평활근 세포 마커를 특징으로 할 수 있다. 모든 실시양태에서, 세포 집단은 마이오카딘 (MYOCD)을 발현할 수 있다. 모든 실시양태에서, 용어 "MYOCD"는 MYOCD 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 및 MYOCD 폴리펩티드를 포함한다.

[0034] 모든 실시양태에서, 세포 집단의 수축 기능은 칼슘-의존적일 수 있다.

[0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 (SMC) 집단을 제공한다. 하나의 실시양태에서, Oct4B, 오스테오폰틴, BMP6, CD44, 및 IL-1B, GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2, VCAM1, PECAM, vWF, 및 Flk-1로 이루어지는 군 중에서 선택되는 적어도 하나의 생체마커가 인간 골수 유래 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 SMC 집단에서 차별적으로 발현된다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2, VCAM1, PECAM, vWF, 및 Flk-1가 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 SMC 집단에서 과소발현된다. 하나의 다른 실시양태에서, 적어도 하나의 Oct4B, 오스테오폰틴, BMP6, CD44, 및 IL-1B가 인간 골수 유래 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 SMC 집단에서 과다발현된다.

[0036] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 골수 유래 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 (a) 적어도 하나의 GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2, VCAM1, PECAM, vWF, 및 Flk-1의 과소발현, 및 (b) 적어도 하나의 Oct4B, 오스테오폰틴, BMP6, CD44, 및 IL-1B의 과다발현을 특징으로 하는 인간 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, SMC 집단은 인간 골수 유래 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 (a) 모든 GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2, VCAM1, PECAM, vWF, 및 Flk-1의 과소발현, 및 (b) 모든 Oct4B, 오스테오폰틴, BMP6, CD44, 및 IL-1B의 과다발현을 특징으로 한다.

[0037] 하나의 다른 실시양태에서, 본 발명은 CD45+인 하나 이상의 세포 및/또는 CD117+인 하나 이상의 세포를 포함하는 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단을 제공한다.

[0038] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 골수 유래 MSC보다 짧은 증식 수명을 갖는 인간 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단을 제공한다.

[0039] 하나의 다른 실시양태에서, 본 발명은 배양시에 접촉 의존성 증식 억제를 보이는 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단을 제공한다.

[0040] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 트롬복산 A2 모방체에 대한 반응에 의한 적어도 하나의 평활근 세포 (SMC) 마커의 하향조절을 특징으로 하는, 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단을 제공한다. 하나의 실시양태에서, SMC 마커는 마이오카딘 및 미오신 중쇄 - 평활근 이소형 (SMMHC)으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 마이오카딘 및 SMMHC는 트롬복산 A2 모방체에 반응하여 하향조절된다.

[0041] 하나의 실시양태에서, 본원에서 설명되는 평활근 세포 집단은 정제된 세포 집단이다.

[0042] 한 측면에서, 본 발명은 지방 조직으로부터 유래된 세포의 제제 또는 집단을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 집단은 지방 조직의 SVF로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, SVF는 불균질한 세포 집단을 함유한다. 하나의 다른 실시양태에서, 세포의 집단은 완전 분화된 평활근 세포를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포 (MSC)의 집단과 구별되는 인간 지방 유래 평활근 세포의 집단을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 구별은 인간 골수 유래 MSC의 집단에 비해 인간 지방 유래 SMC 집단에서 상이한 전사체 (transcriptomic), 단백질체 (proteomic), 및 기능적 특성을 기초로 한다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 자가 공급원으로부터 얻은 지방 조직으로부터 유래된다.

[0043] 또 다른 측면에서, 본 발명은 자가 말초 혈액 또는 지방 공급원으로부터 평활근 세포 집단의 단리 방법을 제공

한다.

[0044] 하나의 실시양태에서, 방법은 (a) 말초 혈액 샘플을 밀도 구배 물질과 접촉시키고; (b) 단핵 분획을 포함하는 밀도 구배를 규정하기 위해 샘플을 원심분리하고; (c) 밀도 구배로부터 단핵 분획을 추출하는 단계를 포함하고, 여기서 분획은 평활근 세포 마커에 양성인, 수축 기능을 갖는 하나 이상의 평활근 세포를 갖는 세포 집단을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 (d) 세포 집단을 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 실시양태에서, 배양된 세포 집단은 배양시에 평활근 세포 콜로니를 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 콜로니는 배양 약 5 내지 약 10일 후에 형성된다. 추가의 실시양태에서, 세포 집단은 내피 콜로니를 형성하지 않는다. 다른 실시양태에서, 방법은 단계 (d)의 세포 집단을 팽창하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 팽창된 세포 집단은 정제된 세포 집단이다.

[0045] 또 다른 실시양태에서, 방법은 (a) 지방 조직 샘플을 콜라게나제로 소화시키고; (b) 기질 혈관 분획 (SVF)을 규정하기 위해 샘플을 원심분리하고; (c) 샘플로부터 SVF를 추출하는 단계를 포함하고, 여기서 분획은 평활근 세포 마커에 양성인, 수축 기능을 갖는 하나 이상의 평활근 세포를 갖는 세포 집단을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 단계 (d)의 세포 집단을 팽창하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 단계 (d)의 세포 집단을 팽창하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 다른 실시양태에서, 팽창된 세포 집단은 정제된 세포 집단이다.

[0046] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 a) 평활근 세포 분화 유도 배지를 사용하지 않으면서 인간 지방 SVF로부터 유래된 이질 평활근 세포 제제를 배양하고; b) 완전 분화된 평활근 세포 집단을 배양된 세포 제제로부터 단리하는 단계를 포함하는, 단리된 평활근 세포 집단을 제공하는 방법을 제공한다. 하나의 다른 실시양태에서, 배양 단계 전에 지방 조직을 효소에 의해 분해하는 단계가 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계 전에 소화된 지방 조직을 원심분리하여 SVF를 제공하는 단계가 수행된다. 다른 실시양태에서, 배양 단계 전에 SVF를 세척 및 플레이팅하는 단계가 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계는 세포 배양 지지체에 부착성인 세포의 선택을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계는 평활근 세포 분화의 유도를 위한 성분을 함유하는 배지의 사용을 포함하지 않는다. 하나의 다른 실시양태에서, 배양 단계는 몇몇의 내인성 성장 인자를 함유하는, 혈청, 예를 들어 우 태아 혈청 (FBS)을 함유하는 세포 배양 배지의 사용을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계는 세포 배양 배지에 대한 특이적인 외인성 성장 인자의 선택 및 첨가를 포함하지 않는다. 일반적으로, "외인성" 성장 인자는 일반적으로 배지의 혈청 성분에 의해, 예를 들어 FBS으로부터 이미 제공된 내인성 성장 인자에 추가로, 선택되어 세포 배양 배지에 첨가된 성장 인자이다. 외인성 성장 인자는 재조합 성장 인자일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 배양 단계는 외인성 성장 인자를 함유하는 세포 배양 배지의 사용을 포함하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계는 재조합 성장 인자를 함유하는 세포 배양 배지의 사용을 포함하지 않는다.

[0047] 모든 실시양태에서, 평활근 세포 집단은 지방 유래 줄기 세포 집단이 아니고/아니거나 평활근 세포 집단은 중간엽 줄기 세포 집단이 아니다.

[0048] 다른 한 측면에서, 본 발명은 새로운 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체를 그를 필요로 하는 대상체에게 제공하기 위한 구조물을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 구조물은 (a) 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함하는 이식형 구조물; 및 (b) 새로운 기관 또는 조직 구조체에 대응하는 천연 기관 또는 조직으로부터 유래되지 않은, 중합체 매트릭스의 표면 상에 또는 그 내에 침착된 자가 세포 집단을 포함한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 네오-방광 또는 그의 일부를 그를 필요로 하는 대상체에게 제공하기 위한 구조물을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 구조물은 (a) 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함하는 이식형 구조물; 및 (b) 대상체의 방광으로부터 유래되지 않은, 중합체 매트릭스의 표면 상에 또는 그 내에 침착된 자가 세포 집단을 포함한다.

[0050] 특정 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물은 타원체 형태를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물은 이식시에 접힌 입체형태로 형성된다. 하나의 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물은 성형된 중합체 매트릭스 구조물의 가요성이 이식시에 보다 크도록 이식 전에 처리된다. 또 다른 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물의 최대 길이는 약 10 ㎝이다. 하나의 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물의 최대 길이는 약 4 ㎝이다. 또 다른 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물의 최대 길이는 약 3 ㎝이다. 또 다른 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물의 최대 폭은 약 4 ㎝이다. 하나의 실시양태에서, 성형된 중합체 매트릭스 구조물의 2D 표면적은 약 30 $㎝^2$이다. 또 다른 실시양태에서,

성형된 중합체 매트릭스 구조물의 2D 표면적은 약 25 $cm^2$이다.

[0051] 다른 실시양태에서, 구조물은 평활근 세포 마커에 양성인 수축 기능을 갖는 하나 이상의 말초 혈액-유래 평활근 세포를 갖는 세포 집단, 또는 평활근 세포 마커에 양성인 수축 기능을 갖는 하나 이상의 지방 조직-유래 평활근 세포를 갖는 세포 집단을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 구조물의 세포 집단은 칼슘-의존적 수축 기능을 갖는다.

[0052] 모든 실시양태에서, 구조물에는 다른 세포 집단이 존재하지 않을 수 있다. 모든 실시양태에서, 구조물에는 요로상피 세포가 존재하지 않을 수 있다. 모든 실시양태에서, 매트릭스 상에 침착된 자가 세포 집단은 본원에서 설명되는 인간 지방 유래 평활근 세포 집단이다. 모든 실시양태에서, 인간 지방 유래 SMC 집단은 SVF로부터 직접 유도될 수 있고, 완전히 분화된다. 모든 실시양태에서, 매트릭스 상에 시딩된 인간 지방 유래 SMC 집단은 구조물을 대상체의 필요로 하는 부위에 이식할 때 MCP-1을 생산하는 능력을 가질 수 있다. 하나의 실시양태에서, MCP-1은 천연 중간엽 줄기 세포를 이식 부위로 유인하는 물질이다.

[0053] 또 다른 측면에서, 본 발명은 그를 필요로 하는 대상체 내에 이식하기 적합한 새로운 기관 또는 조직 구조체 구조물의 제조 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 a) 인간 지방 조직 샘플을 얻고; b) 완전 분화된 평활근 세포 집단을 샘플로부터 단리하고; c) 세포 집단을 배양하고; d) 세포 집단을 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 단계 a), b), c) 및 d)는 약 45일 이내로 수행된다. 모든 실시양태에서, 인간 지방 조직 샘플은 자가 공급원으로부터 얻는다. 하나의 다른 실시양태에서, 방법은 평활근 세포 마커의 발현 검출을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 발현은 mRNA 발현이다. 추가의 실시양태에서, 발현은 폴리펩티드 발현이다. 하나의 실시양태에서, 폴리펩티드 발현은 세포내 면역형광에 의해 검출된다.

[0054] 다른 한 측면에서, 본 발명은 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체를 그를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 a) 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조체의 적어도 일부에 일치하도록 성형된 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고; b) 새로운 기관 또는 조직 구조체에 대응하는 천연 기관 또는 조직으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역 상에 또는 그 내에 침착시키고; c) 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 형성을 위해 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물을 대상체 내에 이식하는 단계를 포함한다. 다른 한 측면에서, 본 발명은 네오-방광 또는 그의 일부를 그를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 a) 방광 또는 그의 일부에 일치하도록 성형된 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고; b) 대상체의 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역 상에 또는 그 내에 침착시키고; c) 네오-방광 또는 그의 일부의 형성을 위해 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물을 대상체 내에 이식하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에서 설명되는 방법의 단계 b)의 세포 집단은 평활근 세포 마커에 양성인 수축 기능을 갖는 하나 이상의 말초 혈액-유래 평활근 세포를 포함하거나, 또는 단계 b)의 세포 집단은 평활근 세포 마커에 양성인 수축 기능을 갖는 하나 이상의 지방 조직-유래 평활근 세포를 포함한다. 하나의 다른 실시양태에서, 세포 집단의 수축 기능은 칼슘-의존적이다. 모든 실시양태에서, 매트릭스 상에 침착된 자가 세포 집단은 본원에서 설명되는 인간 지방 유래 평활근 세포 집단이다. 모든 실시양태에서, 매트릭스 상에 시딩된 인간 지방 유래 SMC 집단은 구조물을 대상체의 필요로 하는 부위에 이식할 때 MCP-1을 생산하는 능력을 갖는다. 하나의 실시양태에서, MCP-1은 천연 중간엽 줄기 세포를 이식 부위로 유인하는 물질이다.

[0055] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 혈관화가 이루어질 수 있도록 이식된 도관 구조물을 대상체의 그물막, 장간막, 근막, 및/또는 복막으로 감싸는 단계를 추가로 포함한다.

[0056] 본 발명은 추가로 대상체로부터 유래된 자가 세포를 시딩한 지지체를 사용하여 그를 필요로 하는 대상체에서 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체를 증대하는 것에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 그러한 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조체의 적어도 일부에 일치하도록 성형된, 복강경을 통해 이식되기에 충분한 크기의 중합체 매트릭스 또는 지지체를 제공하고, 기관 또는 조직 구조체로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역 상에 또는 그 내에 침착시키고, 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체가 팽창되도록 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경을 통해 대상체의 치료 부위 내로 이식함으로써, 그러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체를 팽창시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 관강 기관 또는 조직 구조체는 방광 또는 방광의 일부이다.

[0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 그러한 치료를 필요로 하는 방광의 적어도 일부에 일치하도록 성형된, 복강경을 통해 이식되기에 충분한 크기의 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고, 대상체의 방광으로부

터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역 상에 또는 그 내에 침착시키고, 방광 용적량이 증가하도록 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경을 통해 대상체의 치료 부위 내로 이식함으로써, 그러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 방광의 용적량을 증가시키는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방광 용적량은 약 50 mL 증가한다. 또 다른 실시양태에서, 방광 용적량은 약 100 mL 증가한다.

[0058] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 그러한 치료를 필요로 하는 방광의 적어도 일부에 일치하도록 성형된, 복강경을 통해 이식되기에 충분한 크기의 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고, 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역 상에 또는 그 내에 침착시키고, 방광 절개 부위가 팽창되도록 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경을 통해 대상체의 치료 부위 내로 이식함으로써, 그러한 치료를 필요로 하는 대상체의 방광에서 방광 절개 부위를 팽창시키는 방법을 제공한다.

[0059] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체의 방광의 적어도 일부에 일치하도록 성형된, 복강경을 통해 이식되기에 충분한 크기의 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고, 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역 상에 또는 그 내에 침착시키고, 방광 용적량이 증가하도록 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경을 통해 대상체의 치료 부위 내로 이식함으로써, 그러한 치료를 필요로 하는 대상체에서 요실금의 치료 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명은 본 발명의 중합체 매트릭스 또는 지지체 및 사용 지시서를 포함하는 키트를 추가로 제공한다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이식 후에 대상체에서 새로운 기관 또는 조직 구조체의 재생을 모니터링하기 위한 예측 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 대상체로부터 얻은 시험 샘플 및 대조군 샘플에서 MCP-1의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하고, 여기서 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서의 MCP-1의 보다 높은 발현 수준은 대상체에서 재생을 예측하는 것이다. 또 다른 실시양태에서, 새로운 기관 또는 조직 구조체는 본원에서 설명되는 자가 평활근 세포 집단에서 유도된다. 하나의 다른 실시양태에서, MCP-1 폴리펩티드 발현이 검출된다. 또 다른 실시양태에서, MCP-1 폴리펩티드 발현은 항-MCP-1 물질을 사용하여 검출한다. 하나의 다른 실시양태에서, 항-MCP-1 물질은 항체이다. 또 다른 실시양태에서, MCP-1 폴리펩티드 발현은 면역조직화학을 이용하여 검출한다. 하나의 실시양태에서, 검출 단계 전에 대상체로부터 시험 샘플을 얻는 단계를 수행한다. 또 다른 실시양태에서, 시험 샘플은 혈액이다.

## 도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 방광 증대 지지체의 예를 보여준다.

도 2는 방광 대체 지지체의 예를 보여준다.

도 3은 요로전환 또는 도관 지지체의 예를 보여준다.

도 3a는 상이한 종류의 단면 영역, 및 수뇨관(들)에 연결되도록 구성될 수 있는 개구부 (opening)에 대한 잠재적인 위치를 가진 요로 전환 구조물의 예를 보여준다.

도 3b는 요로 전환 구조물의 변이를 예시한다 (A - 열린 클레임 (claim) 타원형; B - 열린 클레임 타원형 수용기 (receptacle); C - 닫힌 타원형 수용기 및 3개의 관 (tube)).

도 4는 요로 전환 또는 도관 구조물의 상이한 적용을 보여준다.

도 5a-b는 근육 등가 (equivalent) 지지체의 예를 보여준다.

도 6은 패치 또는 스트립의 형태의 다양한 근육 등가 지지체의 영상을 도시한 것이다.

도 7은 상이한 근육 등가 지지체 및 대표적인 이식 방법을 도시한 것이다. 도 7a는 지지체의 평평한 시트의 형성을 도시한 것이다. 도 7b는 이식 시점에 롤링(rolling)되어 복강경 관을 통해 공급되고 복강 내에서 풀릴 수 있는 복강경 이용에 적합한 지지체를 도시한 것이다. 도 7c는 복강경 관을 통한 삽입을 용이하게 하기 위해 롤링된 입체형태의 복강경 이용에 적합한 지지체 시트의 형성을 도시한 것이고, 이것은 그 후에 복강 내에서 펼쳐진다. 도 7d는 관을 통한 삽입을 용이하게 하기 위해 접힌 입체형태 또는 아코디언 스타일의 복강경 이용에 적합한 지지체 시트의 형성을 도시한 것이고, 이것은 그 후에 복강 내에서 펼쳐진다. 도 7e는 근육 등가 지지체의 이식을 위한 가능한 수술 방법을 도시한 것이다. 도 7f는 빈 및 가득 찬 방광 상의 이식 부위를 도시한 것이다. 도 7g는 표면의 절편 시에 생성된 타원체를 보여주는 수술적 슬릿 (slit)을 갖는 방광 모델을 도시한 것이다.

도 8은 복강경 포트 (port)를 통한 삽입을 용이하게 하기 위해 사전에 접힌 아코디언 스타일 지지체 시트를 도시한 것이다.

도 9A는 스트립으로 사전에 절단된 후 함께 봉합되어 쌓기 및 복강경 포트 내로 삽입을 허용하고 복강 내에서 제자리에 고정된 지지체를 도시한 것이다.

도 9B는 2개의 중첩 (fold)을 갖는, 길이 18.7 cm x 폭 2.0 cm의 하나의 지지체를 도시한 것이다.

도 9C는 3개의 중첩을 갖는, 길이 13.3 cm x 폭 2.8 cm의 하나의 지지체를 도시한 것이다.

도 9D는 4개의 중첩을 갖는, 길이 9.7 cm x 폭 4.0 cm의 하나의 지지체를 도시한 것이다.

도 9E는 길이 9.7 cm 및 폭 2.0 cm의, 각각 2개의 중첩의 2개의 조각으로 구성된 하나의 지지체를 도시한 것이다.

도 10은 이식된 도관 구조물에 대한 입체형태의 예를 보여준다.

도 11은 일시적 요로 전환 구조물의 이식된 성분의 예를 보여준다.

도 12는 영구 요로 전환 구조물의 이식된 성분의 예를 보여준다.

도 13은 요로 전환 구조물의 다른 적용을 도시한 것이다.

도 14는 개 말초 혈액 단핵 분획 (백혈구 연층 (buffy coat))의 배양액을 보여준다.

도 15는 개 말초 혈액 과증식 세포를 보여준다.

도 16은 몇몇 계대배양 (passage) 후 개 평활근 세포의 형태학을 보여준다.

도 17은 돼지 및 인간 지방으로부터 단리된 평활근 세포를 보여준다.

도 18은 평활근 세포 마커의 유전자 발현을 위한 RT-PCR 분석을 보여준다.

도 19는 평활근 세포 마커의 면역형광 단백질 발현을 보여준다.

도 20은 세포 인간 말초 혈액으로부터 단리된 평활근의 면역염색을 보여준다.

도 21은 혈액 (a), 지방 조직 (b), 및 방광 조직 (c)으로부터 단리된 돼지 평활근 세포에 대한 수축성 분석의 결과를 보여준다.

도 22는 인간 지방 조직으로부터 단리된 평활근 세포의 성장을 단위 면적당 회수된 세포의 수의 함수로서 보여준다.

도 23은 돼지 지방 (a), 말초 혈액 (b), 및 방광 평활근 (c)으로부터 단리된 평활근 세포의 성장을 계대배양당 회수된 세포의 수의 함수로서 보여준다.

도 24는 인간 방광 평활근, 지방, 말초 혈액, 및 방광 요로상피로부터 단리된 세포에 대한 사이토킨 MCP-1의 발현을 보여준다.

도 25는 MCP-1 생산 및 시딩된 세포 밀도 사이의 상관관계를 보여준다.

도 26은 수뇨관 스텐트 (stent)를 보여준다.

도 27은 네오-도관 구조물을 보여준다.

도 28은 수뇨관 (실선 화살표)에 부착된 네오-도관 구조물 (점선 화살표)를 보여준다.

도 29는 수뇨관 (실선 화살표)에 부착된 구조물의 유입 (inflow) 말단 및 수술에 의해 생성한 스토마 (점선 화살표)를 향하여 보내지는 유출 (outflow) 말단을 보여준다.

도 30은 소변 배액을 위한 스토마 및 카테터 (catheter)를 보여준다.

도 31 내지 32는 무-세포 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 33은 혈액-유래 SMC를 시딩한 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 34 내지 36은 혈액-유래 SMC를 시딩한 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 37은 혈액-유래 SMC를 시딩한 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 38 내지 39는 지방 유래 SMC를 시딩한 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 40 내지 42는 지방 유래 SMC를 시딩한 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 43은 지방 유래 SMC를 시딩한 지지체를 이식한 동물의 방광경 영상을 보여준다.

도 44는 요로관에 대한 트리밍 (trimming) 계획을 보여준다.

도 45는 네오-요로관 구조물을 이식한 동물의 준-조대 (subgross) 사진을 보여준다.

도 46은 네오-요로관 구조물을 이식한 동물에서 수뇨관-도관 접합부 근처의 네오-요로관의 현미경사진을 보여준다.

도 47은 네오-요로관 구조물을 이식한 동물에서 수뇨관-도관 접합부 근처의 네오-요로관의 현미경사진을 보여준다.

도 48은 네오-요로관 구조물을 이식한 동물의 중간-도관 벽의 현미경사진을 보여준다.

도 49는 네오-요로관 (방광 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 50은 네오-요로관 (지방 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 51은 네오-요로관 (지방 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 52는 네오-요로관 (혈액 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 53은 네오-요로관 (혈액 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 54는 네오-요로관 (혈액 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 55는 네오-요로관 (혈액 SMC 지지체)를 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 56은 네오-요로관 (지지체 단독)을 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 57은 네오-요로관 (지지체 단독)을 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 58은 네오-요로관 (지지체 단독)을 이식한 동물에 대한 신우조영술 영상을 보여준다.

도 59는 고정후 도관 (a) 및 트리밍 계획 (b)를 보여준다.  도 59c는 도관의 영역들을 확인해 준다.

도 60은 네오-요로관 (지방 SMC 지지체)를 이식한 동물의 현미경사진을 보여준다.

도 61은 네오-요로관 (방광 SMC 지지체)를 이식한 동물의 현미경사진을 보여준다.

도 62는 네오-요로관 (지방 SMC 지지체)를 이식한 동물의 현미경사진을 보여준다.

도 63은 네오-요로관 (방광 SMC 지지체)를 이식한 동물의 현미경사진을 보여준다.

도 64는 네오-방광 도관을 형성하는 재생된 비뇨기 조직의 조직학 특징을 보여준다.

도 65는 천연 수뇨관-방광 접합부의 3개의 근육 성분을 보여준다.

도 66은 도관 구조물의 수령체의 수뇨관-도관 접합부를 보여준다.

도 67은 이식된 도관 구조물의 조직을 보여준다.

도 68은 돼지 (A) 방광-, (B) 지방-, 및 (C) 말초 혈액-유래 평활근 세포의 형태학적 특색을 보여준다.

도 69는 돼지 방광-, 지방-, 및 말초 혈액-유래 평활근 세포로부터의 평활근 세포 연관 마커의 RT-PCR 분석을 보여준다.

도 70은 돼지 방광, 지방 및 말초 혈액-유래 평활근 세포의 평활근 세포 연관 마커의 면역형광 분석을 보여준다.

도 71은 돼지 (a) 방광-, (b) 지방-, 및 (c) 말초 혈액-유래 평활근 세포의 수축성을 보여준다.

도 72는 (a) 방광-, (b) 지방-, 및 (c) 말초 혈액-유래 평활근 세포의 성장 운동학을 보여준다.

도 73은 이식된 네오-요로관 구조물로부터 형성된 재생된 비뇨기 조직의 조직학 특징을 보여준다.

도 74는 요로 전환 구조물을 이식한 동물에서 상피화 점막의 존재를 보여준다.

도 75는 4개월에서 이식된 네오-방광 구조물에 대한 방광조영상을 보여준다. A - 방광-유래 SMC; B - 혈액-유래 SMC; C - 지방 조직-유래 SMC; D - 천연 방광 기준시점.

도 76은 시간 경과에 따른 이식된 네오-방광 구조물의 (a) 용적 및 (b) 유순성을 보여준다.

도 77은 4개월 초과에서 동물의 평균 체중을 보여준다.

도 78은 4개월 초과에서 동물의 평균 혈청 크레아티닌을 보여준다.

도 79는 4개월 초과에서 동물에 대한 평균 BUN을 보여준다.

도 80은 4개월 초과에서 동물에 대한 평균 알칼리성 포스파타제 (ALP)를 보여준다.

도 81은 4개월 초과에서 동물에 대한 총 단백질 평균을 보여준다.

도 82는 4개월 초과에서 동물에 대한 백혈구 (WBC) 평균을 보여준다.

도 83은 4개월 초과에서 이식된 구조물에 대한 방광조영상을 보여준다 (혈액-유래 SMC).

도 84는 4개월 초과에서 이식된 구조물에 대한 방광조영상을 보여준다 (지방-유래 SMC).

도 85는 인간 방광 발달에서 사이클링 (cycling)의 역할을 입증한다.

도 86은 방광 용적이 연령 및 소변 배출량에 따라 증가함을 입증한다.

도 87a-c는 사이클링이 재생 성과에 영향을 미침을 입증한다.

도 88은 사이클링의 재생-향상 효과를 임상 성과로 번역한 것을 도시한 것이다.

도 89는 근육 등가 지지체의 이식을 보여준다.

도 90은 4주에서 근육 등가 지지체의 이식 후 동물의 방광조영상을 보여준다.

도 91은 지방 유래 세포 집단에서 다양한 마커의 발현 수준을 보여준다: (a) 아디포넥틴 및 FABP-4, (b) SMαA, SM22, 마이오카딘, SMMHC; (c) 칼포닌; (d) VECAD, vWF, PECAM, FLT1; 및 (e) FLK 및 TEK.

도 92는 배지 종류에 대한 평활근 마커의 의존성을 보여준다: (a) SMαA, SM22, 마이오카딘, SMMHC; 및 (b) 칼포닌.

도 93은 지방 유래 세포 및 중간엽 줄기 세포에서 평활근 마커 칼포닌, 마이오카딘 및 SMMHC의 발현의 비교를 보여준다.

도 94는 시간 경과에 따라 지방 유래 세포에서 SMαA, SM22, 마이오카딘 및 칼포닌의 발현을 보여준다.

도 95는 지방 유래 세포 및 중간엽 줄기 세포에서 내피 마커의 발현을 보여준다.

도 96은 지방 유래 세포에서 세포 표면 마커의 발현을 보여준다.

도 97은 중간엽 줄기 세포에서 세포 표면 마커의 발현을 보여준다.

도 98은 MSC, 방광-유래 SMC, Ad-SMC, 및 인간 대동맥 평활근 세포의 단백질체 시그너쳐 (signature)의 비교 분석을 보여준다.

도 99는 배양액 내에서 시간 경과에 따른 지방 유래 세포의 증식 용적을 보여준다.

도 100은 U46619에 대한 지방 유래 세포 및 중간엽 줄기 세포의 반응을 보여준다.

도 101은 중배엽 분화 마커의 RT-PCR 분석의 결과를 보여준다.

도 102는 MSC/AdSMC에서 Oct4A/Oct4B 발현의 RT-PCR 분석의 결과를 보여준다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0063] 본 발명은 본원에서 설명되는 재건, 복구, 증대 또는 대체의 대상인 기관 또는 조직 구조체와 상이한 공급원으

로부터 유래된 세포 집단, 그러한 세포를 단리하는 방법, 그러한 세포를 시딩한 네오-기관/조직 구조체 지지체 또는 매트릭스 (구조물) 및 그의 제조 방법, 및 그러한 네오-기관/조직 구조체 구조물을 사용하는, 그를 필요로 하는 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

[0064] 1. 정의

[0065] 달리 규정하지 않으면, 본원에서 사용되는 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 문헌 [Principles of Tissue Engineering, 3rd Ed. (Edited by R Lanza, R Langer, & J Vacanti), 2007]은 당업자에게 본원에 사용되는 많은 용어에 대한 일반적인 지침을 제공한다.

[0066] 당업자는 본 발명의 실시에 사용될 수 있는, 본원에서 설명되는 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질을 알 것이다. 실제로, 본 발명은 결코 설명되는 방법 및 물질에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적에서, 다음 용어를 아래에 정의한다.

[0067] 용어 "평활근 세포" 또는 "SMC"는 본원에서 사용될 때 본원에서 설명되는 재건, 복구, 증대 또는 대체 구조물 및 방법의 대상인 천연 기관 또는 조직과 상이한 공급원으로부터 유래된 수축 세포를 나타낸다. SMC는 말초 혈액 또는 지방 조직으로부터 유래될 수 있다. 지방 조직에 대해, SMC는 혈관 조직을 함유하는 SVF로부터 유래될 수 있다. 따라서, SMC는 지방 유래 혈관상 (vascular bed)의 모세혈관, 세동맥 및 세정맥으로부터 유래될 수 있거나, SMC는 혈관주위세포를 함유하는 혈관주위 오목 (niche)으로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 제공되는 평활근 세포는 일단 본원에서 설명되는 지지체 또는 매트릭스 상에 시딩되고 배양되면, 유강 (hollow) 기관 (예를 들어 방광, 복강, 위장관 등)의 벽에서 발견되고 수축 및 이완하는 능력을 특징으로 하는 비-횡문근을 형성할 수 있다. 당업자는 평활근 세포의 다른 속성을 알 것이다.

[0068] 용어 "세포 집단"은 본원에서 사용될 때 적합한 포유동물 조직 공급원으로부터 직접 단리하고 후속적으로 시험관 내에서 배양하여 얻어진 많은 세포를 나타낸다. 당업자는 본 발명에서 사용하기 위해 적합한 세포 집단 내의 다양한 많은 세포 및 본 발명에서 사용하기 위한 세포 집단을 단리 및 배양하기 위한 다양한 방법, 및 본 발명에서 사용하기 위해 적합한 세포 집단 내의 다양한 많은 세포를 알 것이다. 세포 집단은 지방세포 또는 비-부착성 지방 세포가 실질적으로 없는 지방 유래 평활근 세포 집단 (SMC)일 수 있다. SMC 집단은 평활근 세포와 연관된 마커의 발현을 특징으로 할 수 있다. SMC 집단은 또한 정제된 세포 집단일 수 있다. SMC 집단은 자가 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0069] 용어 "자가"는 동일한 개체의 신체로부터 유래되거나 전달되는 것을 나타낸다. 자가 평활근 세포 집단은 본원에서 설명되는 이식형 구조물의 수령체가 될 대상체로부터 유래된다.

[0070] 용어 "마커" 또는 "생체마커"는 일반적으로 배양된 세포 집단 내의 그의 발현 또는 존재가 표준 방법 (또는 본원에 개시된 방법)에 의해 검출될 수 있고 특정 종류의 세포인 배양된 세포 집단 내의 하나 이상의 세포와 일치하는, DNA, RNA, 단백질, 탄수화물, 또는 당지질-기반 분자 마커를 나타낸다. 일반적으로, 용어 세포 "마커" 또는 "생체마커"는 대개 천연 세포에 의해 발현되는, 본원에서 설명되는 세포 집단 내에서 발현된 분자를 나타낸다. 마커는 세포에 의해 발현되는 폴리펩티드 또는 염색체 상의 확인가능한 물리적인 위치, 예를 들어 유전자, 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위 또는 천연 세포에 의해 발현되는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (예를 들어, mRNA)일 수 있다. 마커는 "유전자 발현 마커"로서 언급되는 유전자의 발현 영역, 또는 공지의 코딩 기능이 없는 DNA의 일부 분절일 수 있다.

[0071] 용어 "평활근 세포 마커"는 일반적으로 배양된 세포 집단 내의 그의 발현 또는 존재가 표준 방법 (또는 본원에 개시된 방법)에 의해 검출될 수 있고 평활근 세포인 배양된 세포 집단 내의 하나 이상의 세포와 일치하는, DNA, RNA, 단백질, 탄수화물, 또는 당지질-기반 분자 마커를 나타낸다. 일반적으로, 용어 평활근 세포 (SMC) "마커" 또는 "생체마커"는 일반적으로 천연 평활근 세포에 의해 발현되는 분자를 나타낸다. 마커는 세포에 의해 발현되는 폴리펩티드 또는 염색체 상의 확인가능한 물리적인 위치, 예를 들어 유전자, 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위 또는 SMC에 의해 발현되는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산일 수 있다. 마커는 "유전자 발현 마커"로서 언급되는 유전자의 발현 영역, 또는 공지의 코딩 기능이 없는 DNA의 일부 분절일 수 있다. 본 발명에서 고려되는 상기 마커는 다음 중 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 마이오카딘, 알파-평활근 액틴, 칼포닌, 미오신 중쇄, BAALC, 데스민, 근섬유모세포 항원, SM22, 및 이들의 임의의 조합.

[0072] 상호 교환가능하게 사용되는 용어 "차별적으로 발현되는 유전자", "차별적인 유전자 발현" 및 이들의 동의어는 그의 발현이 제2 세포 또는 세포 집단에서의 그의 발현에 비해 제1 세포 또는 세포 집단에서 더 높거나 더 낮은 수준으로 활성화되는 유전자를 나타낸다. 또한, 이들 용어는 그의 발현이 배양시의 제1 또는 제2 세포의 계대

배양 동안 시간 경과에 따른 상이한 시기에서 더 높거나 더 낮은 수준으로 활성화되는 유전자를 포함한다. 또한, 차별적으로 발현되는 유전자가 핵산 수준 또는 단백질 수준에서 활성화 또는 억제될 수 있거나, 또는 상이한 폴리펩티드 생성물을 유도하는 선택적 스플라이싱 (alternative splicing)에 적용될 수 있음이 이해된다. 그러한 차이는 예를 들어 폴리펩티드의 mRNA 수준, 표면 발현, 분비 또는 다른 분배의 변화에 의해 제시될 수 있다. 차별적인 유전자 발현은 2개 이상의 유전자 또는 그의 유전자 생성물 사이의 발현 비교, 또는 2개 이상의 유전자 또는 그의 유전자 생성물 사이의 발현 비율의 비교, 또는 심지어 동일한 유전자의 2개의 상이하게 프로세싱된 생성물 (제1 세포와 제2 세포 사이에서 상이함)의 비교를 포함할 수 있다. 차별적인 발현은 예를 들어 제1 세포와 제2 세포 사이에서 유전자 또는 그의 발현 생성물의 시간적 또는 세포성 발현 패턴의 정량적 및 정성적 차이를 모두 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 제1 세포와 제2 세포의 제시된 유전자의 발현 사이에, 또는 배양시의 세포의 계대배양 동안 시간 경과에 따른 상이한 시기에 적어도 약 1배, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 3.5배, 적어도 약 4배, 적어도 약 4.5배, 적어도 약 5배, 적어도 약 5.5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 10.5배, 적어도 약 11배, 적어도 약 11.5배, 적어도 약 12배, 적어도 약 12.5배, 적어도 약 13배, 적어도 약 13.5배, 적어도 약 14배, 적어도 약 14.5배, 또는 적어도 약 15배의 차이가 존재할 때 "차별적인 유전자 발현"이 존재하는 것으로 간주된다. 마커의 차별적인 발현은 중간엽 줄기 세포 또는 MSC (제2 세포)에서의 발현에 비해 지방 유래 세포 (제1 세포)에서 발생할 수 있다.

[0073] 용어 "억제하다", "하향조절하다", "하향발현하다" 및 "감소시키다"는 상호 교환가능하게 사용되고, 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 하위단위를 코딩하는 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 하위단위의 활성이 하나 이상의 대조군, 예를 들어 하나 이상의 양성 및/또는 음성 대조군에 비해 감소됨을 의미한다. 과소발현은 MSC에서의 발현에 비해 지방 유래 세포에서 발생할 수 있다.

[0074] 용어 "상향조절" 또는 "과다발현"은 유전자의 발현, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 하위단위를 코딩하는 RNA 분자 또는 동등한 RNA 분자의 수준, 또는 하나 이상의 단백질 또는 단백질 하위단위의 활성이 하나 이상의 대조군, 예를 들어 하나 이상의 양성 및/또는 음성 대조군에 비해 증가됨을 의미하기 위해 사용된다. 과다발현은 MSC에서의 발현에 비해 지방 유래 세포에서 발생할 수 있다.

[0075] 용어 "수축 기능"은 미오신의 칼슘-활성화 인산화에 의해 개시되어 세포내 칼슘 수준에 의존하는 수축을 유발하는, 활주하는 액틴과 미오신 미세섬유의 상호작용을 수반하는 평활근 수축 기능을 의미한다.

[0076] 용어 "접촉-의존적 억제"는 2개 이상의 세포가 서로 접촉할 때 세포 성장이 정지됨을 나타낸다. 상기 특성의 부재는, 그 성장이 접촉에 의해 억제되지 않는 세포가 형질전환된 세포 배양액에서의 초점 (focus) 형성에 유사한, 서로의 상부에 축적될 수 있는 세포 배양액에서 관찰될 수 있다. 중간엽 줄기 세포는 상기 특성을 보이지 않는다. 이와 대조적으로, 접촉-의존적 억제 특성을 갖는 세포는 배양시에 서로의 상부에 축적되는 것으로 관찰되지 않을 것이다.

[0077] 용어 "말초 혈액"은 일반적으로 신체 전체에 걸쳐 순환하는 혈액을 의미할 것이다.

[0078] 용어 "지방 조직" 또는 "지방"은 일반적으로 주로 지방세포로 이루어진 느슨한 연결 조직을 의미한다. 지방 조직은 피부 밑 (피하 지방) 및 내부 기관 주위 (내장 지방)를 포함하고 이로 제한되지 않는 신체 내의 다양한 위치로부터 얻을 수 있다.

[0079] 용어 "구조물"은 하나 이상의 합성 또는 천연 발생 생체적합성 물질로 이루어진 지지체 또는 매트릭스의 표면상에 또는 그 내에 침착된 적어도 하나의 세포 집단을 의미한다. 세포 집단은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 지지체 또는 매트릭스와 조합될 수 있다.

[0080] 용어 "샘플" 또는 "환자 샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 일반적으로 개체, 체액, 신체 조직, 세포주, 조직 배양액, 또는 다른 공급원으로부터 얻은 임의의 생물학적 샘플을 의미한다. 이 용어는 예를 들어, 혈액, 예를 들어 말초 혈액 또는 정맥 혈액, 소변과 같은 체액 및 생물학적 기원의 다른 액체 샘플, 예를 들어 지방흡인물, 및 고체 조직 생검, 예를 들어 생검 시료 (예를 들어, 지방 조직 생검), 또는 조직 배양액 또는 이로부터 유래된 세포, 및 그의 자손체를 포함한다. 또한, 이 정의는 공급원으로부터 얻은 후에 임의의 방식으로, 예를 들어 특정 성분, 예를 들어 단백질 또는 폴리뉴클레오티드에 대한 시약 처리, 가용화 또는 농축에 의해 조작된 샘플을 포함한다. 또한, 이 정의는 임상 샘플을 포함하고, 배양액, 세포 상등액, 세포 용해물, 혈청, 혈장, 생물학적 유체, 및 조직 샘플 내의 세포도 포함한다. 샘플의 공급원은 고체 조직, 예를 들어 신선한, 동결된 및/또는 보

존된 기관 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 체액, 예를 들어 뇌척수액, 양수, 복수, 또는 간질액; 대상체의 발달에 있어서의 임의의 시간으로부터의 세포일 수 있다. 생물학적 샘플은 자연적으로 조직과 함께 또는 조직 내에 존재하지 않는 화합물, 예를 들어 보존제, 항응고제, 버퍼, 고정제, 영양물질, 항생제 등을 포함할 수 있다. 샘플은 진단 또는 모니터링 분석에 사용될 수 있다. 포유동물로부터 샘플을 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 용어 "샘플"이 단독으로 사용될 경우, 이는 "샘플"이 "생물학적 샘플" 또는 "환자 샘플"임을 의미한다. 즉, 이 용어들은 상호 교환가능하게 사용된다. 샘플은 또한 시험 샘플일 수 있다.

[0081] 용어 "시험 샘플"은 본원에 기재된 구조물의 이식 후에 대상체로부터 얻은 샘플을 의미한다. 시험 샘플은 혈액, 혈청, 소변, 정액, 골수, 점막, 조직 등을 포함하고 이로 제한되지 않는, 포유동물 대상체의 다양한 공급원으로 기원할 수 있다.

[0082] 용어 "대조군" 또는 "대조군 샘플"은 음성 결과가 시험 샘플에서의 양성 결과와의 상호관련을 돕는 것으로 예상되는 음성 대조군을 의미한다. 별법으로, 대조군은 양성 결과가 시험 샘플에서의 음성 결과와의 상호관련을 돕는 것으로 예상되는 양성 대조군을 의미한다. 본 발명에 적합한 대조군은 정상 수준의 사이토킨을 갖는 것으로 알려진 샘플, 본원에 기재된 구조물이 이식되지 않은 것으로 알려진 포유동물 대상체로부터 얻은 샘플, 및 정상인 것으로 알려진 포유동물 대상체로부터 얻은 샘플을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 또한, 대조군은 본원에 기재된 구조물의 이식 전에 대상체로부터 얻은 샘플일 수 있다. 또한, 대조군은 시험 샘플에 포함된 세포와 동일한 기원을 갖는 정상 세포를 함유하는 샘플일 수 있다. 당업자는 본 발명에 사용하기 적합한 다른 대조군을 알 것이다.

[0083] 용어 "환자"는 치료가 요구되는 임의의 단일 동물, 보다 바람직하게는 포유동물 (예를 들어, 개, 고양이, 말, 토끼, 동물원 동물, 소, 돼지, 양 및 비-인간 영장류와 같은 비-인간 동물 포함)을 의미한다. 가장 바람직하게는, 본원에서 환자는 인간이다.

[0084] 용어 "대상체"는 불완전한, 손상된 또는 비-기능적 비뇨기계를 포함하는 불완전한 기관 기능 또는 부전의 하나 이상의 징후, 증상, 또는 다른 표시 상태를 경험하고 있거나 경험한, 치료에 적합한 환자를 포함하는 임의의 단일 인간 대상체를 의미한다. 상기 대상체는 그 원인에 상관없이 불완전한 기관 기능 또는 부전을 갖는 것으로 새로 진단되거나 이전에 진단되었고 현재 재발 또는 재현을 경험하고 있거나 또는 발생할 위험이 있는 대상체를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대상체는 불완전한 기관 기능 또는 부전과 연관된 질병에 대해 이전에 치료된 적이 있거나 그렇지 않을 수 있다. 대상체는 방광절제가 필요한 방광암에 걸린 대상체, 신장 기능에 영향을 주는 신경성 방광을 갖는 대상체, 방광에 대한 방사선 손상을 갖는 대상체 및 난치성 실금을 갖는 대상체를 포함하고 이로 제한되지 않는, 요로 전환술의 후보일 수 있다. 대상체는 그 원인에 상관없이 현재 요로 전환술이 필요한 것으로 진단되거나, 또는 이전에 요로 전환술이 필요한 것으로 진단되었고 현재 합병증을 경험하고 있거나, 또는 불완전한, 손상된 또는 비-기능적 비뇨기계의 위험이 존재할 수 있다. 대상체는 불완전한, 손상된 또는 비-기능적 비뇨기계와 연관된 상태에 대해 이전에 치료된 적이 있거나 그렇지 않을 수 있다.

[0085] 용어 "요로전환체" 또는 "도관"은 시간 경과에 따른 대상체의 이식된 요로 전환 구조물, 문합된 수뇨관, 및 인접 강 (atrium)과의 상호작용에 의해 생성되는 기관 또는 조직 구조체를 의미한다. 강은 소변이 복벽을 통과할 수 있도록 하는 전방의 연결 공동이고, 구조물의 뒤쪽 말단 (복강내에 위치함)을 피부에 연결하는 복막 외피의 가장 전방의 관-유사 부분에 의해 형성될 수 있다.

[0086] 용어 "뒤쪽" 및 "앞쪽"은 소변 생산 및 유동과 관련된 기술적인 용어이다. 용어 "뒤쪽"은 이식시에 스토마에 가장 근접하는 요로 전환 구조물의 말단을 나타내고, 용어 "앞쪽"은 이식시에 신장 및 수뇨관에 가장 근접하는 요로 전환 구조물의 말단을 나타낸다.

[0087] 용어 "잔해물 (detritis)"은 요로 전환 구조물의 이식 후에 발생하는 치유 및 재생 과정 동안 형성되는 부스러기를 의미한다. 잔해물은 박락된 조직 세포, 염증성 삼출물 및 지지체 생분해물로 이루어질 수 있다. 도관이 상기 부스러기에 의해 막힐 경우 (부적절한 유출), 정체된 부스러기가 도관의 관강 내에 잔해물 또는 반고체 덩어리를 형성한다.

[0088] 용어 "괴사조직 제거 (debridement)"는 감염을 방지하고 폐색을 방지하고 치유 과정을 촉진하기 위해 도관으로부터 외래 물질, 또는 찢긴, 실활된, 오염된 또는 죽은 조직의 수술적 또는 비-수술적 제거를 의미한다. 괴사조직 제거는 잔해물의 제거를 수반할 수 있다.

[0089] 용어 "스토마"는 소변을 요로 전환 구조물의 배액 유출 말단으로부터 체외로 통과시키기 위해 사용되는, 수술에

의해 생성된 개구부를 의미한다. 소변은 일반적으로 신체 외부의 저장기에 수집된다.

[0090] 용어 "스토마 포트" 또는 "스토마 버튼"은 스토마 개구부의 통합성을 유지하기 위해 사용되는 장치와 같은 수단을 의미한다.

[0091] 용어 "팽창하는" 또는 "증대하는"는 본원에서 사용될 때 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 크기를 증가시키는 것을 나타낸다. 예를 들어, 본 발명의 한 측면에서, 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체는 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 또는 29% 증대될 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체는 예를 들어 기존의 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 기존의 용적량을 증가시키기 위해 증대될 수 있다.

[0092] 용어 "용적량"은 본원에서 사용될 때 규정된 영역에 함유될 수 있는 액체의 양을 의미한다.

[0093] "재생 예후" 또는 "재생의 예후"는 일반적으로 본원에 기재된 구조물의 이식의 가능한 경과 또는 성과의 예지 또는 예상을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 재생 예후는 다음 중 임의의 하나 이상의 예지 또는 예상을 포함한다: 방광 대체 또는 증대 후의 기능적 방광의 발생 또는 개선, 도관 이식 후의 기능적 요로 전환의 발생, 개선된 방광 용적의 발생, 및 개선된 방광 순응의 발생. 본원에서 사용되는 바와 같이, "재생의 예후"는 새로운 기관 또는 조직 구조체의 이식의 가능한 경과 또는 성과의 예지 또는 예상을 의미한다. 몇몇 실시양태에서, "재생에 대한 예후"는 다음 중 임의의 하나 이상의 예지 또는 예상 (그에 대한 예측)을 포함한다: 방광 대체 또는 증대 후의 기능적 방광의 발생 또는 개선, 도관 이식 후의 기능적 요로 전환의 발생, 방광 용적 또는 개선된 방광 용적의 발생, 및 방광 순응 또는 개선된 방광 순응의 발생.

[0094] "재생된 조직"은 본원에 기재된 구조물의 이식 후에 발생하는 새로운 기관 또는 조직 구조체의 조직을 의미한다. 기관 또는 조직 구조체는 방광 또는 방광의 일부일 수 있다. 재생된 조직은 평활근이 그 밑에 있는 연속적인 요로상피를 포함할 수 있다.

[0095] **2. 세포 집단**

[0096] 본 발명은 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 재건, 복구, 증대 또는 대체에 사용하기 위한 평활근 세포의 집단을 제공하고, 여기서 세포 집단은 수축 기능을 갖고 하나 이상의 평활근 세포 마커에 양성인 적어도 하나의 세포를 포함한다.

[0097] 본원에 논의된 바와 같이, 얇은 막으로 구성된 관강 기관 및 조직 구조체, 예를 들어 일반적으로 요로상피 및 평활근층으로 구성된 방광 또는 방광 성분의 재건, 복구, 증대 또는 대체에 사용하기 위한 이식형 세포-시딩된 매트릭스를 제공하기 위해 조직 공학 원리가 성공적으로 적용되었다 (문헌 [Becker et al. Eur. Urol. 51, 1217-1228 (2007)]; [Frimberger et al. Regen. Med. 1, 425-435 (2006)]; [Roth et al. Curr. Urol. Rep. 10, 119-125 (2009)]; [Wood et al. Curr. Opin. Urol. 18, 564-569]). 평활근 세포는 환자 자신의 조직, 예를 들어 방광, 요도, 수뇨관 및 다른 비뇨생식 조직으로부터 유래될 수 있다. 그러나, 예를 들어, 암성 방광 조직의 치료 동안과 같이 새롭고 건강한 공학처리된 조직을 발달시키기 위한 기초 단위로서 1차 기관 부위로부터 세포 배양 시스템의 개발 및 유지에 대한 의존성과 연관된 도전과제가 남아있다. 명백하게, 그러한 암성 세포는 이식형 네오-방광 지지체 또는 매트릭스에 거주하기에 부적절하다.

[0098] 본 발명은 재건, 복구, 증대 또는 대체 대상인 기관 또는 조직 구조체와 상이한 공급원으로부터 유래된 세포 집단을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 공급원은 자가 공급원이다.

[0099] 또 다른 측면에서, 세포 집단은 평활근 세포 집단과 일치하거나 평활근 세포 집단에 전형적인 마커를 발현한다.

[0100] 다른 한 측면에서, 본 발명은 재건, 복구, 증대 또는 대체 대상인 관강 기관 또는 조직 구조체와 상이한 공급원으로부터 단리된 평활근 세포 집단을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 관강 기관 또는 조직 구조체는 방광 또는 방광의 일부이다.

[0101] 한 측면에서, 공급원은 말초 혈액이다. 하나의 실시양태에서, 말초 혈액-유래 평활근 세포 집단은 환자 샘플로부터 유래한다. 환자 샘플은 정맥 혈액일 수 있다.

[0102] 한 측면에서, 공급원은 지방 조직이다. 하나의 실시양태에서, 지방 조직-유래 평활근 세포 집단은 환자 샘플로부터 유래한다. 환자 샘플은 복부성형 절차 동안 제거된 지방 조직, 또는 지방흡인물일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 환자 샘플.

[0103] 추가의 다른 하나의 실시양태에서, 본 발명의 단리된 세포 집단은 배양시에 골-마루 (hill-and-valley) 형태, 하나 이상의 평활근 세포 마커의 발현, 수축 기능, 미세섬유 형성, 및 사이토킨 합성을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 평활근 세포 특징을 발생시킬 수 있다.

[0104] 한 측면에서, 배양된 세포 집단은 그의 골-마루 형태를 특징으로 한다. 골-마루 형태를 갖는 세포는 계대배양시에 가늘고 긴 형태의, 평평한 및 섬유모세포-유사한, 길게 늘어난 및 평행한 줄로 배열된, "빙빙 도는" 성장 양상, 및 이들의 임의의 조합을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 특징을 가질 수 있다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 적절한 배지 내에서 배양할 때 배양된 평활근 세포에 전형적인 "골-마루 형태"를 발생시킨다.

[0105] 또 다른 측면에서, 배양된 세포 집단은 하나 이상의 평활근 세포 마커의 존재를 특징으로 한다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 적절한 배지 내에서 배양할 때 마이오카딘, 알파-평활근 액틴, 칼포닌, 미오신 중쇄, BAALC, 데스민, 근섬유모세포 항원, SM22, 및 이들의 임의의 조합 중의 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는 검출가능한 평활근 세포 마커를 발생시킨다.

[0106] 또 다른 측면에서, 배양된 세포 집단은 하나 이상의 세포 표면 마커를 발현하는 하나 이상의 세포의 존재를 특징으로 한다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 적절한 배지 내에서 배양할 때 CD73, CD90, CD105, CD166, CD31, CD54, CD56, CD117, 및 이들의 임의의 조합 중의 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는 세포 표면 마커에 양성인 하나 이상의 세포를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 적절한 배지 내에서 배양할 때 CD45+, CD31+, CD54+, CD56+, CD90+, 및 CD105+인 하나 이상의 세포를 함유한다.

[0107] 다른 한 측면에서, 배양된 세포 집단은 수축 기능이 있는 하나 이상의 세포의 존재를 특징으로 한다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 적절한 배지 내에서 배양할 때 수축 기능을 발생시킨다. 또 다른 실시양태에서, 수축 기능은 칼슘 의존적이다. 하나의 다른 실시양태에서, 칼슘-의존적 수축 기능은 칼슘 킬레이터를 사용한 수축의 억제에 의해 입증된다. 또 다른 실시양태에서, 칼슘 킬레이터는 EDTA이다. 당업자는 당업계에 공지된 다른 킬레이터가 적합할 수 있음을 알 것이다.

[0108] 추가의 또 다른 측면에서, 배양된 세포 집단은 미세섬유 형성을 특징으로 한다. 하나의 실시양태에서, 세포 집단은 적절한 배지 내에서 배양할 때 미세섬유 형성을 거치게 된다.

[0109] 한 측면에서, 세포 집단은 하나 이상의 사이토킨을 발현하는 적어도 하나의 세포를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 사이토킨은 MCP-1, 온코스타틴 M, IL-8, 및 GRO로 이루어지는 군 중에서 선택된다.

[0110] 한 측면에서, 본 발명의 세포 집단은 단리 후 배양시에 한정된 증식 수명을 갖는다. 다른 실시양태에서, 세포 집단의 수명은 약 1회 계대배양, 약 2회 계대배양, 약 3회 계대배양, 약 4회 계대배양, 약 5회 계대배양, 약 6회 계대배양, 약 7회 계대배양, 약 8회 계대배양, 약 9회 계대배양, 약 10회 계대배양, 약 11회 계대배양, 약 12회 계대배양, 약 13회 계대배양, 약 14회 계대배양, 약 15회 계대배양, 약 16회 계대배양, 약 17회 계대배양, 또는 약 18회 계대배양이다. 바람직한 실시양태에서, 세포 집단의 배양시 수명은 5회 이하의 계대배양이다. 지방 유래 SMC는 일반적으로 계대배양 사이에 3-5일 배양될 수 있고, 혈액-유래 SMC는 일반적으로 제1 계대배양 전에 14일, 이어서 추가의 계대배양 동안에는 3-5일 배양될 수 있다 (보다 상세한 내용은 실시예 1 참조).

[0111] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이 지지체 또는 매트릭스 상에 침착되고 그를 필요로 하는 대상체 내에 이식될 때 본원에서 고려되는 재건, 복구, 증대, 또는 대체의 대상인 기관 또는 조직 구조체에 재생 효과를 제공하는 적어도 하나의 재생 세포를 함유하는 재생 세포 집단을 제공한다. 재생 세포 집단은 그를 필요로 하는 환자 내로 이식될 때 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 재생을 자극하거나 개시시키는 능력을 갖는다. 일반적으로, 기관 또는 조직 구조체의 재생은 세포 성분의 복구, 조직 구성 및 구조, 기능 및 제어된 발생을 특징으로 한다. 또한, 재생 세포 집단은 세포-시딩된 관강 기관 또는 조직 구조체 구조물의 이식 부위에서 발생하는 경향이 있는 불완전성 또는 질환을 최소화한다. 이식 부위에서의 구성 해체 (disorganization)는 그 자체를 증가된 콜라겐 침착 및/또는 흉터 조직 형성으로서 나타날 수 있고, 이들은 각각 재생 세포 집단의 사용을 통해 최소화될 수 있다. 또한, 특정 세포 사건은 재생 과정을 나타낸다. 본원에 기재된 세포 집단 및 지지체를 사용하여 재생된 방광 또는 방광의 일부의 경우에, 재생하는 기관 또는 조직 구조체는 관강 표면을 향하여 연장되는 수많은 미세혈관 주위에서 방사상으로 퍼지는 섬유혈관 조직을 갖는 평활근 실질, 및 점막 표면에 배열된 잘 발달된 혈관을 갖는 기질 요소로 구성된다 (상기 제이요 II 참조). 재생하는 방광 또는 방광의 일부는 또한 스핀들로이드 (spindloid)/중간엽 세포 및 αSMA 양성 근육 전구체 세포의 존재를 특징으로 한다. 하나의 실시양태에서, αSMA 양성 스핀들로이드 세포는 신생기질 (neostromal) 조직 내 및 다발성 네오-혈관 (세동맥) 주위에서 관찰된다.

[0112] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 지지체 또는 매트릭스 상에 침착되고 그를 필요로 하는 대상체 내에 이식될 때 본원에서 고려되는 재건, 복구, 증대, 또는 대체의 대상인 기관 또는 조직 구조체에 대한 수복 효과를 제공하는 세포 집단을 제공한다. 다른 실시양태에서, 수복 효과는 흉터 조직 형성 및/또는 콜라겐 침착을 특징으로 한다. 당업자는 당업계에 공지되어 있는 복구의 다른 특징을 알 것이다.

[0113] 또 다른 측면에서, 재생 세포 집단은 복구된 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 크기의 적응 제어 (adaptive regulation)를 특징으로 하는 재생 효과를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 재생 세포 집단의 재생 효과는 재생 세포 집단을 시딩한 지지체 또는 매트릭스를 수용하는 대상체에 특이적인 적응 제어의 확립이다. 하나의 실시양태에서, 적응 제어는 네오-방광이 대상체의 신체 크기에 비례하는 크기로 성장하고 발달하도록 본원에 기재된 구조물을 사용한 대상체의 방광의 대체 또는 증대이다.

[0114] 하나의 실시양태에서, 재생 자극이 가능한 세포 집단은 케모카인 생성물 MCP-1을 발현하는 적어도 하나의 세포를 함유하는 MCP-1 생산 세포 집단이다. MCP-1 재생 자극은 이식 부위에 대한 특정 세포 종류의 동원을 특징으로 한다. 하나의 실시양태에서, MCP-1은 네오-방광 내에서 증식하기 위해 근육 전구 세포를 이식 부위로 동원한다. 또 다른 실시양태에서, MCP-1은 재생 과정을 용이하게 하기 위해 다양한 사이토킨 및/또는 케모카인을 생산하는 단핵구를 이식 부위로 동원한다. 하나의 다른 실시양태에서, MCP-1은 대망 (omental) 세포가 근육 세포로 발생하는 것을 유도한다.

[0115] 한 측면에서, 본 발명은 조직 재생의 대리 마커로서의 특이적 사이토킨, 예를 들어 MCP-1의 용도를 제공한다. 상기 마커는 어떤 기능이 재건되었는지를 기초로 한 재생 평가와 함께 사용될 수 있다. 재생 시간 경과에 걸친 대리 마커의 모니터링은 재생의 예측 표지자로서 기능할 수 있다.

[0116] 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 정제된 세포 집단이다. 본원에 기재된 정제된 세포 집단은 형태, 마커의 발현, 및 기능 중의 하나 이상을 기초로 한 표현형을 특징으로 한다. 표현형은 골-마루 형태, 하나 이상의 평활근 세포 마커의 발현, 사이토킨의 발현, 배양시 한정된 증식 수명, 수축 기능, 및 미세섬유 형성을 유도하는 능력 중의 하나 이상을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 표현형은 본원에 기재되거나 당업자에게 공지된 다른 특색을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 정제된 집단은 본원에 기재된 평활근 세포 집단에 대해 실질적으로 균질하다. 실질적으로 균질한 정제된 집단은 일반적으로 형태, 마커의 발현, 및 기능 중의 하나 이상에 의해 판단할 때 적어도 약 90% 균질하다. 다른 실시양태에서, 정제된 집단은 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99.5% 균질하다.

[0117] 또 다른 실시양태에서, 평활근 세포 집단은 인간 지방 조직으로부터 직접 유래되고, 인간 골수 유래 중간엽 줄기 세포 (MSC)에서의 그의 발현 수준에 비해 오스테오폰틴, Oct4B, 성장 분화 인자 5 (GDF5), 간세포 성장 인자 (HGF), 백혈병 억제 인자 (LIF), 흑색종 세포 부착 분자 (MCAM), 혈관 세포 부착 분자 1 (VCAM1), PECAM, vWF, Flk-1, runt-관련 전사 인자 2 (RUNX2), 골 형태형성 단백질 6 (BMP6), CD44, 및 IL-1B 중 하나 이상의 차별적인 발현을 특징으로 한다. 하나의 다른 실시양태에서, SMC 집단은 인간 골수 유래 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 (a) GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2, VCAM1, PECAM, vWF, 및 Flk-1 중 하나 이상을 과소-발현하고/하거나, (b) Oct4B, 오스테오폰틴, BMP6, CD44, 및 IL-1B 중의 하나 이상을 과다발현한다. 하나의 다른 실시양태에서, SMC 집단은 인간 골수 유래 MSC에서의 그의 발현 수준에 비해 (a) GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2, VCAM1, PECAM, vWF, 및 Flk-1을 모두 과소-발현하고/하거나, (b) Oct4B, 오스테오폰틴, BMP6, CD44, 및 IL-1B를 모두 과다발현한다.

[0118] 또 다른 실시양태에서, 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단은 CD45+인 하나 이상의 세포 및/또는 CD117+인 하나 이상의 세포를 포함한다.

[0119] 다른 실시양태에서, 본 발명은 인간 골수 유래 MSC보다 증식 수명이 더 짧은 인간 지방 조직으로부터 직접 유래된 평활근 세포 집단을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, SMC 집단은 배양시에 접촉 의존성 증식 억제를 보인다. 하나의 다른 실시양태에서, 지방 조직으로부터 직접 유래된 SMC 집단은 트롬복산 A2 모방체에 반응한, 적어도 하나의 평활근 세포 (SMC) 마커의 하향-조절을 특징으로 한다. 다른 실시양태에서, SMC 마커는 마이오카딘 및 미오신 중쇄 - 평활근 이소형 (SMMHC)으로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 마이오카딘 및 SMMHC는 트롬복산 A2 모방체에 반응하여 하향-조절된다.

[0120] 모든 실시양태에서, SMC 집단은 자가 공급원으로부터 유래된다.

[0121] 한 측면에서, 본 발명은 호흡기 질환에 대한 본원에서 설명되는 평활근 세포 집단의 적용을 고려한다. 기도 평활근은 대부분의 척추동물의 기관지에 존재한다. 호흡기 질환은 대상체가 폐 근육의 부적당한 기능으로 인한

결함성 호흡계를 갖는 질환이다. 특정 세포 집단이 폐에 투여될 때 유익한 효과를 제공할 수 있는 것으로 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Ohnishi et al. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2008 December; 3(4): 509-514]). 천식, 폐기종, 또는 만성 폐쇄성 폐 질병 (COPD)과 같은 호흡기 질환이 있는 개체는 이들 SMC 집단으로부터 이익을 얻을 수 있다. 폐암이 있는 개체가 또한 이익을 얻을 수 있다. 하나의 실시양태에서, 자가 SMC 세포 집단은 그를 필요로 하는 대상체의 지방 조직 또는 말초 혈액으로부터 단리될 수 있다. 세포 집단은 대상체의 폐 내의 위치에서의 이식에 적합한 지지체 상에 시딩될 수 있다. 본 발명의 세포 집단의 이점은 대상체가 결합성 호흡계, 예를 들어, 폐암에 걸린 경우에, 적합한 SMC가 대상체의 폐로부터의 공급을 위해 이용가능하지 않을 수 있다는 점이다. 세포 집단은 폐암의 경우에서와 같이 대상체의 폐의 일부 또는 전부가 제거된 경우에 사용될 수 있다. 대상체에서 폐 또는 폐의 일부의 제거 시에, 자가 SMC 집단이 생검으로부터 단리되고, 배양되고, 적합한 지지체 상에 시딩되고, 대상체 내에 이식되어 새로운 폐 또는 새로운 폐 조직 구조체를 제공할 수 있다.

[0122] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 SMC 집단의 눈 질환에 대한 적용을 고려한다. 눈 질환은 대상체가 눈 근육의 부적당한 기능으로 인한 결함성 눈을 갖는 질환이다. 평활근은 눈에서 모양체근으로서 존재하고, 가변 거리에서 사물을 보기 위해 눈 적응을 제어하고, 슐렘 (Schlemm) 관을 통한 방수 (aqueous humour)의 유동을 조절한다. 평활근은 또한 눈의 홍채 내에 존재한다. 노안 및 원시와 같은 안과 질환이 있는 개체는 이들 SMC 집단으로부터 이익을 얻을 수 있다. 폐암이 있는 개체가 또한 이익을 얻을 수 있다. 하나의 실시양태에서, 자가 SMC 세포 집단은 그를 필요로 하는 대상체의 지방 조직 또는 말초 혈액으로부터 단리될 수 있다. 세포 집단은 대상체의 눈 내의 위치에서의 이식을 위해 적합한 지지체 상에 시딩될 수 있다. 본 발명의 세포 집단의 이점은 대상체가 결함있는 눈을 갖는 경우에 또는 눈 조직의 제한된 이용가능성 때문에, 적합한 SMC가 대상체의 눈으로부터의 공급을 위해 이용가능하지 않을 수 있다는 점이다. 자가 SMC 집단은 생검으로부터 단리되고, 배양되고, 적합한 지지체 상에 시딩되고, 대상체 내에 이식되어 새로운 눈 조직을 제공할 수 있다.

[0123] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 평활근 세포 집단은 지지체를 사용하지 않으면서, 예를 들어 생착 (engraftment)에 의해 호흡기 질환 또는 눈 질환이 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 생착 방법을 알 것이다.

[0124] 하나의 실시양태에서, 자가 SMC 세포 집단은 그를 필요로 하는 대상체의 지방 조직 또는 말초 혈액으로부터 단리될 수 있다. 세포 집단은 대상체의 폐 내의 위치에서의 이식을 위해 적합한 지지체 상에 시딩될 수 있다. 본 발명의 세포 집단의 이점은 대상체가 결합성 호흡기 질환, 예를 들어, 폐암에 걸린 경우에, 적합한 SMC가 대상체의 폐로부터의 공급을 위해 이용가능하지 않을 수 있다는 점이다. 세포 집단은 폐암의 경우에서와 같이 대상체의 폐의 일부 또는 전부가 제거된 경우에 사용될 수 있다. 대상체에서 폐 또는 폐의 일부의 제거시에, 자가 SMC 집단이 생검으로부터 단리되고, 배양되고, 적합한 지지체 상에 시딩되고, 대상체 내에 이식되어 새로운 폐 또는 폐 조직 구조체를 제공할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 평활근 세포 집단은 지지체를 사용하지 않으면서, 예를 들어 생착에 의해 호흡기 질환이 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 당업자는 적합한 생착 방법을 알 것이다.

[0125] **3. 세포 집단의 단리 방법**

[0126] 자가 세포 집단은 치료를 필요로 하는 대상체로부터 직접 유래된다. 대상체의 공급원 조직은 일반적으로 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조체와 동일하지 않다. 자가 세포 집단은 환자 자신의 조직으로부터, 예를 들어, 지방 조직 또는 말초 혈액으로부터 유래될 수 있다. 자가 세포는 생검에서 단리될 수 있다. 또한, 세포는 동결되거나 사용 전에 팽창될 수 있다.

[0127] 세포-시딩된 지지체의 구성을 위해, 평활근 세포를 포함하는 대상체로부터 얻은 샘플(들)은 적절한 세포 현탁액(들) 내로 분리 (dissociation)된다. 세포의 단리 및 배양 방법은 본원에 구체적으로 참고로 포함된 미국 특허 5,567,612에 논의되어 있다. 일정 기간, 예를 들어 1주의 시험관내 배양 후에 단일 세포 현탁액이 형성될 수 있기 때문에, 세포들의 단일 세포기로의 분리는 초기 1차 배양에 필수적이지 않다. 조직 분리는 세포외 매트릭스 및 세포를 함께 유지하는 세포간 접합부의 기계적 및 효소에 의한 파괴에 의해 수행될 수 있다. 자가 세포는 지지체 상에 시딩하기 위해 이용가능한 세포의 수를 증가시키기 위해, 원하는 경우에 시험관 내에서 배양될 수 있다.

[0128] 세포는 시딩하기 전에 유전자 물질로 형질감염시킬 수 있다. 평활근 세포는 중합체 시딩 전에 특정 유전자로 형질감염시킬 수 있다. 세포-중합체 구조물은 숙주 또는 조직 조작된 네오-기관의 장기간 생존을 위해 요구되는 유전 정보를 보유할 수 있다.

[0129] 세포 배양액은 세포 분획 (fractionation) 단계를 이용하여 또는 이용하지 않으면서 제조될 수 있다. 세포 분획법은 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 세포 분획법은 세포 크기, DNA 함량, 세포 표면 항원, 및 생활력에 기초하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 평활근 세포는 지방 조직으로부터 농축될 수 있는 반면, 내피 세포 및 지방세포는 평활근 세포 수집을 위해 감소될 수 있다. 세포 분획법이 사용될 수 있지만, 본 발명을 실시하기 위해 필수적인 것은 아니다.

[0130] 본원에서 설명되는 방법에서 또 다른 선택적인 절차는 냉동보존이다. 냉동 보존은 예를 들어 다수의 침습적인 수술 절차에 대한 필요를 감소시키기 위해 유용할 수 있다. 대상체로부터의 생검 또는 샘플로부터 취한 세포를 증폭할 수 있고, 증폭된 세포의 일부는 사용될 수 있고 다른 일부는 냉동 보존될 수 있다. 세포를 증폭하고 보존하는 능력은 요구되는 수술 절차의 횟수를 감소시킬 수 있다. 냉동 보존의 활용의 또 다른 예는 조직 은행 (bank)이다. 자가 세포는 예를 들어 공여자 조직 은행으로 저장될 수 있다. 새로운 기관 또는 조직 구조체를 위해 세포가 필요할 때, 세포의 냉동보존된 공급체를 필요한 만큼 사용할 수 있다. 그들의 기존의 기관 또는 조직 구조체를 위험하게 할 수 있는 질병이 있거나 치료를 받고 있는 환자는 하나 이상의 생검을 냉동 보존할 수 있다. 나중에, 환자 자신의 기관 또는 조직 구조체가 실패하면, 냉동 보존된 자가 세포를 해동하여 치료를 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, 암이 치료 후에 새로운 기관 또는 조직 구조체에서 재발생하면, 냉동 보존된 세포가 추가의 생검을 필요로 하지 않으면서 기관 또는 조직 구조체의 재건을 위해 사용될 수 있다.

[0131] 평활근 세포는 다음 일반적인 프로토콜에 기초하여 지방 또는 말초 혈액으로부터 단리될 수 있다. 적합한 중량 (예를 들어, 그램 단위) 및/또는 면적 (예를 들어, $cm^2$)의 지방 생검 시료를 얻을 수 있다. 적절한 부피의 말초 혈액 (예를 들어, ml)은 새로운 기관 또는 조직 구조체 구조물의 계획된 이식 전에 얻을 수 있다.

[0132] 다음은 국제 세포 치료 학회 (International Society for Cellular Therapy; ISCT) 기준에서 규정된 바와 같은 다수의 세포 종류, 예를 들어 내피 및 평활근 세포 및 MSC-유사 세포인 세포로 구성된 이질 세포 집단을 나타내는 지방의 기질 혈관 분획 (SVF)으로부터 평활근 세포의 단리에 적합한 프로토콜의 대표적인 예이다 (문헌 [Domini et al. 2006 Cytotherapy 8:4, 315-317]). 적합한 그램 중량의 지방 조직 (예를 들어, 7-25 g)을 생검에 의해 얻고, PBS로 세척하고 (예를 들어, 3회), 스캘펠 (scalpel) 및 가위로 저미고, 50 mL 원추형 튜브로 옮기고 37℃에서 60분 동안 DMEM-HG 중의 콜라게나제 (예를 들어, 0.1 내지 0.3%) (워딩턴 (Worthington)) 및 1% BSA의 용액 내에서 인큐베이션할 수 있다. 소화를 용이하게 하기 위해, 튜브를 연속적으로 요동시키거나 주기적으로 진탕할 수 있다. SVF를 600 g에서 10분 동안 원심분리에 의해 펠렛화하고 DMEM-HG + 10% FBS 내에 재현탁시킬 수 있다. 이어서, 기질-혈관 분획을 사용하여 계대배양 제로를 시딩할 수 있다.

[0133] 다음은 말초 혈액으로부터 평활근 세포의 단리에 적합한 프로토콜의 대표적인 예이다. 적합한 부피의 말초 혈액 (예를 들어, 25 ml)을 PBS 내에 1:1로 희석하고, 50 mL 원추형 튜브 내에 25 ml 히스토파크 (Histopaque)-1077 (시그마 (Sigma))를 사용하여 적층하였다. 원심분리 (예를 들어, 800 g, 30 min) 후에, 단핵 분획을 수집하고, PBS로 1회 세척하고, α-MEM/10% FBS (인비트로겐 (Invitrogen)) 내에 재현탁시켜, 계대배양 제로를 시딩할 수 있다.

[0134] 당업자는 평활근 세포의 단리를 위한 추가의 방법을 알 것이다.

[0135] 한 측면에서, 본 발명은 평활근 세포로의 분화를 유도하는 조건을 필요로 하지 않으면서, SVF로부터 단리된 평활근 세포 집단을 단리하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 a) 지방 조직을 얻고, b) 지방 조직을 소화시키고, c) 소화된 지방 조직을 원심분리하여 기질 혈관 분획 (SVF)을 제공하고, d) 평활근 세포로의 분화를 유도하는 조건을 필요로 하지 않으면서 SVF를 배양하고, e) 지방 조직-유래 SVF로부터 평활근 세포 집단을 단리하는 것을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 배양 단계는 SVF를 세척하고, SVF를 세포 배양 배지 내에 재현탁하고, 재현탁된 SVF를 플레이팅하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계는 세포 배양 지지체, 예를 들어 플레이트 또는 용기에 부착성인 세포 집단의 제공을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 배양된 세포 집단을 팽창시키는 것을 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 평활근 세포 특징에 대해 평활근 세포 집단을 분석하는 것을 추가로 포함한다. 하나의 실시양태에서, 지방 조직은 자가 공급원으로부터 유래된다.

[0136] 하나의 실시양태에서, 배양 조건은 지방 조직 SVF-유래 세포 집단의 평활근 세포로의 분화를 유도하기 위한 세포 배양 성분의 사용을 요구하지 않는다. 문헌 [Jack et al., J Biomaterials 30 (2009) 3529-3270]에서는 줄기 세포를 평활근 세포로 분화시키기 위해 SVF로부터 유래된 미분화된 지방 줄기 세포를 헤파린 함유 유도 배지 내에서 6주 동안 인큐베이션한 것을 보고하였다 (또한, 미국 특허 7,531,355 (Rodriguez) 참조). 잭 (Jack)

등에 의해 보고된 줄기 세포는 상기 인큐베이션 기간 동안 분리 (splitting)를 필요로 하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 배양 조건은 유도 배지, 예를 들어 헤파린 함유 유도 배지의 사용을 요구하지 않는다. 하나의 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 세포 집단을 평활근 세포로 분화시키기 위해 또는 세포 집단을 배양 및 팽창하기 위해 외인성 성장 인자의 사용을 요구하지 않는 배양 조건의 사용을 포함한다.

[0137] 다른 보고된 방법에 비해 본 발명의 방법의 이점은 지방 유래된 줄기 세포를 평활근 세포로 분화시키는 단계의 제거를 포함하고, 이것은 지방 생검을 얻고 그로부터 평활근 세포 집단을 단리하기까지의 시간을 감소시킨다. 또한, 분화를 유도하기 위한 다른 세포 배양 배지 성분, 예를 들어 외인성 성장 인자에 대한 필요를 제거하는 것은 비용 면에서 유리하다.

[0138] 다른 한 측면에서, 본 발명은 수축 기능이 있고 하나 이상의 평활근 세포 마커에 대해 양성인 적어도 하나의 세포를 함유하는 평활근 세포의 집단을 단리하고 배양하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 재건, 복구, 증대 또는 대체를 필요로 하는 환자로부터 샘플을 얻는 단계를 포함하고, 여기서 샘플은 재건, 복구, 증대 또는 대체를 필요로 하는 관강 기관 또는 조직 구조체로부터 수득되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 평활근 세포는 환자 샘플로부터 유래된다. 하나의 다른 실시양태에서, 관강 기관 또는 조직 구조체는 방광 또는 방광의 일부이다. 하나의 실시양태에서, 샘플은 자가 샘플이다. 또 다른 실시양태에서, 샘플은 말초 혈액 샘플이다. 또 다른 실시양태에서, 샘플은 지방 조직 샘플이다. 지방 조직은 복부성형 절차의 결과로서 대상체로부터 제거된 조직일 수 있다.

[0139] 또 다른 실시양태에서, 수득 단계 후에 분리 단계가 이어진다.

[0140] 말초 혈액 샘플의 경우에, 분리 단계는 샘플을 밀도 구배 물질과 접촉시키고, 단핵 분획을 갖는 밀도 구배를 규정하기 위해 샘플을 원심분리하고, 밀도 구배로부터 단핵 분획을 추출하는 것을 포함한다. 분리 단계 후에 배양 단계가 이어질 수 있고, 여기서 추출된 분획으로부터의 세포가 배양된다.

[0141] 지방 조직 샘플의 경우에, 정제 단계는 샘플을 콜라게나제로 소화시키고, 소화된 샘플을 원심분리하고, 원심분리된 샘플을 1차 지방세포로부터 별개의 기질 세포에 혼합하고, 혼합된 샘플을 원심분리하여 후속적인 배양을 위해 재현탁될 수 있는 기질-혈관 분획을 얻는 것을 포함한다.

[0142] 한 측면에서, 본 발명은 분화 유도성 세포 배양 배지를 사용하지 않으면서 단리된 평활근 세포 (SMC) 집단을 제공하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 방법은 a) 지방 조직 생검을 얻고, b) 지방 조직을 효소에 의해 분해하고, c) 소화된 지방 조직을 원심분리하여, 이질적 세포 집단을 함유하는 기질 혈관 분획 (SVF)을 제공하고, d) 불균질한 세포 집단을 세척하고 플레이팅하고; e) 평활근 세포 분화 유도 배지를 사용하지 않으면서 세포 집단을 배양하고, f) 완전 분화된 SMC 집단을 배양된 세포로부터 단리하는 단계를 포함한다. 하나의 다른 실시양태에서, 배양 단계 e)는 세포 배양 지지체에 부착성인 세포의 선택을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계 e)는 외인성 성장 인자를 함유하는 세포 배양 배지의 사용을 포함하지 않는다. 하나의 실시양태에서, 배양 방법은 당업자에 공지된 표준 조건에 의해 최소 필수 배지 (예를 들어, DMEM 또는 α-MEM) 및 우 태아 혈청 (예를 들어, 10% FBS)을 함유하는 세포 배양 배지의 사용을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 평활근 세포 집단은 지방 유래 줄기 세포 집단이 아니다. 하나의 다른 실시양태에서, 평활근 세포 집단은 중간엽 줄기 세포 집단이 아니다.

[0143] **4. 지지체**

[0144] U.S. 6576019 (Atala) (그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 설명되어 있는 바와 같이, 지지체 또는 중합체 매트릭스는 다양한 상이한 물질로 구성될 수 있다. 일반적으로, 생체적합성 물질 및 특히 생분해성 물질이 본원에서 설명되는 지지체의 제조를 위해 바람직한 물질이다. 지지체는 적어도 2개의 별개의 표면을 갖는 이식형 생체적합성, 합성 또는 천연 중합체 매트릭스이다. 지지체는 치료를 필요로 하는 관강 기관 또는 조직 구조체의 적어도 일부에 일치하도록 성형된다. 생체적합성 물질은 생분해가능하다. 생체적합성은 생물학적 기능에 대한 독성 또는 손상 효과가 없는 물질을 나타낸다. 생분해성은 환자의 신체 내에서 흡수되거나 분해될 수 있는 물질을 나타낸다. 생분해성 물질의 예는 예를 들어, 흡수성 봉합사를 포함한다. 지지체를 형성하기 위한 대표적인 물질은 제어된 속도에서 가수분해에 의해 분해되고 재흡수되는 천연 또는 합성 중합체, 예를 들어, 콜라겐, 폴리(알파 에스테르), 예를 들어 폴리(락테이트산), 폴리(글리콜산), 폴리오르토에스테르 및 폴리안히드라이드 (polyanhydride) 및 그들의 공중합체를 포함한다. 이들 물질은 분해성, 관리가능성, 크기 및 입체형태의 최대 제어를 제공한다. 바람직한 생분해성 중합체 물질은 흡수성 합성 봉합사 물질로서 개발된 폴리글리콜산 및 폴리글락틴을 포함한다. 폴리글리콜산 및 폴리글락틴 섬유는 제조자가 제공하는 그대로 사용할 수 있다. 다른

지지체 물질은 셀룰로스 에테르, 셀룰로스, 셀룰로직 에스테르, 플루오르화 폴리에틸렌, 폴리-4-메틸펜텐, 폴리아크릴로니트릴, 폴리아미드, 폴리아미드이미드, 폴리아크릴레이트, 폴리벤족사졸, 폴리카르보네이트, 폴리시아노아릴에테르, 폴리에스테르, 폴리에스테르카르보네이트, 폴리에테르, 폴리에테르에테르케톤, 폴리에테르이미드, 폴리에테르케톤, 폴리에테르술폰, 폴리에틸렌, 폴리플루오로올레핀, 폴리이미드, 폴리올레핀, 폴리옥사디아졸, 폴리페닐렌 옥시드, 폴리페닐렌 술피드, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리술피드, 폴리술폰, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리티오에테르, 폴리트리아졸, 폴리우레탄, 폴리비닐, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 재생 셀룰로스, 실리콘, 우레아-포름알데히드, 또는 상기 물질의 공중합체 또는 물리적 블렌드를 포함한다. 물질은 적합한 항미생물제로 함침될 수 있고, 가시성을 개선하고 수술 절차를 돕기 위해 착색 첨가제에 의해 착색될 수 있다.

[0145] 생분해성인 다른 지지체 물질은 에티콘 컴퍼니 (Ethicon Co.; 미국 뉴저지주 소머빌)에서 제조된 합성 봉합사 물질, 예를 들어 모노크릴 (MONOCRYL)™ (글리콜리드와 엡실론-카프로락톤의 공중합체), 비크릴 (VICRYL)™ 또는 폴리글락틴 910 (폴리글락틴 370 및 스테아르산칼슘으로 코팅된 락티드와 글리콜리드의 공중합체), 및 파나크릴 (PANACRYL)™ (카프로락톤 및 글리콜리드의 중합체로 코팅된 락티드와 글리콜리드의 공중합체) (문헌 [Craig P. H., Williams J. A., Davis K. W., et al.: A Biological Comparison of Polyglactin 910 and Polyglycolic Acid Synthetic Absorbable Sutures. Surg. 141; 1010, (1975)]) 및 폴리글리콜산을 포함한다. 이들 물질은 제조자가 공급하는 그대로 사용될 수 있다.

[0146] 또 다른 실시양태에서, 매트릭스 또는 지지체는 천연 탈세포화 (decellularized) 기관의 일부를 사용하여 생성할 수 있다. 생체구조체, 또는 기관의 일부는 기관으로부터 전체 세포 및 조직 내용물을 제거함으로써 탈세포화될 수 있다. 탈세포화 과정은 일련의 순차적인 추출을 포함한다. 상기 추출 과정의 하나의 핵심적인 특색은 생체구조체의 복잡한 하부-구조 (infra-structure)를 교란 또는 파괴할 수 있는 가혹한 추출이 회피되는 것이다. 제1 단계는 세포 부스러기의 제거 및 세포막의 가용화를 포함한다. 이후에 핵 세포질 성분 및 핵 성분의 가용화가 이어진다.

[0147] 바람직하게는, 생체구조체, 예를 들어, 기관의 일부는 부드러운 기계적 파괴 방법을 이용하여 기관의 일부를 둘러싸는 세포막 및 세포 부스러기를 제거함으로써 탈세포화된다. 부드러운 기계적 파괴 방법은 세포막을 파괴하기에 충분해야 한다. 그러나, 탈세포화 과정은 생체구조체의 복잡한 하부-구조의 손상 또는 교란을 피해야 한다. 부드러운 기계적 파괴 방법은 기관 일부의 표면을 긁어내거나, 기관 일부를 휘젓거나, 기관을 적합한 부피의 유체, 예를 들어, 증류수 내에서 교반하는 것을 포함한다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 부드러운 기계적 파괴 방법은 세포막이 파괴되고 세포 부스러기가 기관으로부터 제거될 때까지 기관 일부를 적합한 부피의 증류수 내에서 교반하는 것을 포함한다.

[0148] 세포막이 제거된 후, 생체구조체의 핵 및 세포질 성분이 제거된다. 이것은 하부-구조를 파괴하지 않으면서 세포성 및 핵 성분을 가용화시킴으로써 수행할 수 있다. 핵 성분을 가용화시키기 위해, 비-이온성 세제 또는 계면활성제를 사용할 수 있다. 비이온성 세제 또는 계면활성제의 예는 많은 판매회사로부터 상업적으로 이용가능한 트리톤 X-100, 트리톤 N-101, 트리톤 X-114, 트리톤 X-405, 트리톤 X-705, 및 트리톤 DF-16을 포함하는, 롬 앤드 하스 (Rohm and Haas, 미국 펜실베니아주 필라델피아)로부터 이용가능한 트리톤 (Triton) 계열; 트윈 (Tween) 계열, 예를 들어 모노라우레이트 (트윈 20), 모노팔미테이트 (트윈 40), 모노올레에이트 (트윈 80), 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르 (Brij. 35), 폴리옥시에틸렌 에테르 W-1 (폴리옥스 (Polyox)) 등, 콜린산나트륨, 데옥시콜레이트, CHAPS, 사포닌, n-데실-D-글루코푸라노시드, n-헵틸-D-글루코피라노시드, n-옥틸-D-글루코피라노시드 및 노니데트 (Nonidet) P-40을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0149] 당업자는 상기 분류에 속하는 화합물을 상업적으로 얻을 수 있고, 이들 화합물 및 판매회사에 대한 설명을 문헌에서 볼 수 있음을 알 것이다 (문헌 ["Chemical Classification, Emulsifiers and Detergents", McCutcheon's, Emulsifiers and Detergents, 1986, North American and International Editions, McCutcheon Division, MC Publishing Co., Glen Rock, N.J., U.S.A.] 및 [Judith Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem. R., Hoechst Celanese Corp., 1987]). 한 바람직한 실시양태에서, 비-이온성 계면활성제는 트리톤 계열, 바람직하게는, 트리톤 X-100이다.

[0150] 비-이온성 세제의 농도는 탈세포화된 생체구조체의 종류에 따라 변경될 수 있다. 예를 들어, 섬세한 조직, 예를 들어, 혈관에 대해, 세제의 농도는 감소되어야 한다. 비-이온성 세제의 바람직한 농도 범위는 약 0.001 내지 약 2.0% (w/v), 보다 바람직하게는, 약 0.05 내지 약 1.0% (w/v), 훨씬 더 바람직하게는, 약, 0.1% (w/v) 내지 약 0.8% (w/v)일 수 있다. 바람직한 상기 농도 범위는 약 0.001 내지 약 0.2% (w/v)이고, 약 0.05 내지

약 0.1% (w/v)가 특히 바람직하다.

[0151] 치밀한 세포질 미세섬유 네트워크, 세포간 복합체 및 첨단부 (apical) 미세세포 구조체를 포함하는 세포골격 성분은 알칼리성 용액, 예를 들어 수산화암모늄을 사용하여 가용화될 수 있다. 세포골격 성분을 가용화시키기 위해 암모늄염 또는 그들의 유도체로 이루어지는 다른 알칼리성 용액을 또한 사용할 수 있다. 다른 적합한 암모늄 용액의 예는 황산암모늄, 아세트산암모늄 및 수산화암모늄을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 수산화암모늄이 사용된다.

[0152] 알칼리성 용액, 예를 들어 수산화암모늄의 농도는 탈세포화된 생체구조체의 종류에 따라 변경될 수 있다. 예를 들어, 약한 조직, 예를 들어 혈관의 경우, 세제의 농도는 감소될 수 있다. 바람직한 농도 범위는 약 0.001 내지 약 2.0% (w/v)일 수 있고, 보다 바람직하게는 약 0.005 내지 약 0.1% (w/v), 훨씬 더 바람직하게는 약 0.01% (w/v) 내지 약 0.08% (w/v)일 수 있다.

[0153] 탈세포화된 동결건조된 구조체는 사용을 위해 필요할 때까지 적합한 온도에서 보관될 수 있다. 사용 전에, 탈세포화된 구조체는 적합한 등장성 버퍼 또는 세포 배양 배지에서 평형화될 수 있다. 적합한 버퍼는 인산염 완충 염수 (PBS), 염수, MOPS, HEPES, 행크의 균형 염 용액 (Hank's Balanced Salt Solution) 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 적합한 세포 배양 배지는 RPMI 1640, 피셔 (Fisher), 이스코브 (Iscove), 맥코이 (McCoy), 둘베코 (Dulbecco) 배지 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0154] 사용될 수 있는 또 다른 생체적합성 물질은 스테인레스 스틸, 티탄, 실리콘, 금 및 실라스틱 (silastic)을 포함한다.

[0155] 중합체 매트릭스 또는 지지체는 보강될 수 있다. 예를 들어, 보강재는 합성 매트릭스 또는 지지체의 형성 동안 첨가되거나 이식 전에 천연 또는 합성 매트릭스에 부착될 수 있다. 보강재를 형성하기 위한 대표적인 물질은 제어된 속도에서 가수분해에 의해 분해되고 재흡수되는 천연 또는 합성 중합체, 예를 들어, 콜라겐, 폴리(알파에스테르), 예를 들어 폴리(락테이트산), 폴리(글리콜산), 폴리오르토에스테르 및 폴리안히드라이드 및 그들의 공중합체를 포함한다. 이들 물질은 분해성, 관리가능성, 크기 및 입체형태의 최대 제어를 제공한다.

[0156] 생분해성 중합체는 기계적 특성, 예를 들어 인스트론 (Instron) 시험기를 사용한 인장 강도, 겔 투과 크로마토그래피 (GPC)에 의한 중합체 분자량, 시차주사열량계 (DSC)에 의한 유리 전이 온도 및 적외선 (IR) 분광법에 의한 결합 구조에 대해; 에임스 (Ames) 분석 및 시험관내 최기성 (teratogenicity) 분석 및 면역원성에 대한 동물에서의 이식 연구, 염증, 방출 및 분해 연구를 수반하는 초기 스크리닝 시험에 의한 독성에 대해 특성화될 수 있다. 시험관내 부탁 및 생활력은 주사 전자현미경, 조직학 및 방사성 동위원소를 사용한 정량적 평가를 사용하여 평가될 수 있다. 또한, 생분해성 물질은 환자에 이식될 때 물질이 분해되는데 필요한 시간에 대해 특성화될 수 있다. 예를 들어 두께 및 메쉬 (mesh) 크기와 같은 구성을 변경함으로써, 생분해성 물질은 약 2년 내지 약 2개월, 바람직하게는 약 18월 내지 약 4개월, 가장 바람직하게는 약 15개월 내지 약 8개월, 가장 바람직하게는 약 12개월 내지 약 10개월에 실질적으로 분해될 수 있다. 필요한 경우, 생분해성 물질은 약 3년 또는 약 4년 또는 약 5년 또는 그 초과의 시간 내에 실질적으로 분해되지 않도록 구성될 수 있다.

[0157] 중합체 매트릭스 또는 지지체는 상기한 바와 같은 제어된 세공 구조를 갖도록 제조될 수 있다. 세공의 크기는 세포 분배를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 중합체 매트릭스 또는 지지체의 세공은 세포가 한 표면으로부터 대향 표면으로 이동할 수 있도록 클 수 있다. 별법으로, 세공은 중합체 매트릭스 또는 지지체의 양면 사이에 유체가 소통하지만 세포는 통과할 수 없을 정도로 작을 수 있다. 상기 목적의 달성에 적합한 세공 크기는 약 0.04 마이크로미터 내지 약 10 마이크로미터의 직경, 바람직하게는 약 0.4 마이크로미터 내지 약 4 마이크로미터의 직경일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체의 표면은 세포 집단의 세공 내로의 부착 및 이동을 허용하기에 충분히 큰 세공을 포함할 수 있다. 세공 크기는 세포가 중합체 매트릭스 또는 지지체의 한 측면에서 대향 측면으로 이동하는 것을 억제하기 위해 중합체 매트릭스 또는 지지체의 내부에서 감소될 수 있다. 세공 크기가 감소된 중합체 매트릭스 또는 지지체의 한 실시양태는 2개의 큰 세공 물질 사이에 샌드위치된 작은 세공 물질의 적층된 구조이다. 폴리카르보네이트 막이 특히 적합하고, 그 이유는 이 막이 예를 들어 약 0.01 마이크로미터, 약 0.05 마이크로미터, 약 0.1 마이크로미터, 약 0.2 마이크로미터, 약 0.45 마이크로미터, 약 0.6 마이크로미터, 약 1.0 마이크로미터, 약 2.0 마이크로미터 및 약 4.0 마이크로미터와 같은 매우 조절된 세공 크기로 제작될 수 있기 때문이다. 마이크로미터 미만의 수준의 중합체 매트릭스 또는 지지체는 세균, 바이러스 및 다른 미생물에 대해 불투과성일 수 있다.

[0158] 특히 다음 특징 또는 기준이 각각의 별개의 매트릭스 또는 그의 일부의 설계시에 고려된다: (i) 형태, (ii) 강

도, (iii) 강직도 및 강성, 및 (iv) 봉합성 (매트릭스 또는 그의 일부가 인접 조직에 용이하게 봉합되거나 또는 다른 방식으로 부착되는 정도). 본원에서 사용되는 바와 같이, 제시된 매트릭스 또는 지지체의 강직도는 지지체를 변형하기 위해 작용하는 단위면적당 응력과 그로부터 발생하는 변형의 양 사이의 비를 표현하는 계수인 탄성률에 의해 규정된다 (예를 들어, 문헌 [Handbook of Biomaterials evaluation, Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials, 2nd edition, edited by Andreas F. von Recum, (1999)]; [Ratner, et al., Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press (1996)] 참조). 지지체의 강성은 제시된 지지체에 의해 보이는 가요성의 정도 (또는 그의 결핍)을 나타낸다.

[0159] 각각의 상기 기준은 매트릭스 또는 그의 일부가 의도되는 의료 적응증 및 생리학적 기능을 처리하기 위해 최적으로 배치되고 변형될 수 있도록 변경될 수 있는 변수이다 (특히, 물질 및 제조 방법의 선택을 통해). 예를 들어, 방광 대체, 재건 및/또는 증대를 위한 매트릭스 또는 지지체를 포함하는 물질은 소변의 불규칙적인 부피를 수용하기에 충분히 순응성이고 찢어지지 않으면서 봉합사를 지지하기에 충분히 강하여야 한다.

[0160] 최적으로, 매트릭스 또는 지지체는, 그의 생분해 후에 생성되는 재건된 방광이 천연 방광과 유사한 방식으로 비게 될 때 접힐 수 있고, 요도 카테터가 누출점을 남기지 않으면서 새로운 기관 또는 조직 구조체로부터 제거되면서 수뇨관이 막히지 않도록 성형되어야 한다. 생물공학처리된 방광 구조물은 일체형으로 생산될 수 있거나 또는 각각의 부분이 개별적으로 생산되거나 구획의 조합물이 특정 부분으로서 생산될 수 있다. 각각의 특정 매트릭스 또는 지지체 부분은 특정 기능을 갖도록 생산될 수 있다. 또는, 특정 부분은 제조 편의를 위해 생산될 수 있다. 특정 부분은 특정 물질로 구성될 수 있고, 특정 특성을 부여하기 위해 설계될 수 있다. 특정 부분 특성은 0.5 내지 1.5 $MPa^2$의 천연 조직 (예를 들어, 수뇨관)에 유사한 인장 강도 및 30 내지 100%의 한계 신장률을 포함하거나 또는 인장 강도는 0.5 내지 28 $MPa^2$일 수 있고, 한계 신장률은 10-200%일 수 있고, 압축 강도는 <12일 수 있다.

[0161] 원형, 부채꼴, 평평한 형태, 별 모양, 단독 또는 다른 섬유와 얽힌 형태일 수 있는 섬유로 형성된 메쉬-유사 구조가 바람직하다. 분지형 섬유의 사용은 부피 증가에 비례하여 표면적이 증가하는 문제를 해결하기 위해 자연이 이용하는 동일한 원리를 기초로 한다. 모든 다세포 유기체는 상기 반복 분지형 구조를 이용한다. 분지 시스템은 기관 사이의 연결 네트워크, 및 개별적인 기관의 기능 단위를 나타낸다. 세포의 상기 입체형태에 대한 시딩 및 이식은 매우 많은 수의 세포의 이식을 가능하게 하고, 이들 세포는 각각 숙주 환경에 노출되고, 혈관신생이 달성되면서 영양물질과 폐기물이 자유롭게 교환될 수 있다. 중합체 매트릭스 또는 지지체는 요구되는 최종 형태, 구조 및 기능에 따라 가요성이거나 경질 상태로 만들 수 있다.

[0162] 하나의 바람직한 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 평균 섬유 직경이 15 ㎛인 폴리글리콜산으로 형성되고, 4-0 폴리글락틴 910 봉합사를 사용하여 방광 성형 몰드 내로 형성된다. 생성되는 구조체는 적절한 기계적 특성을 달성하고 그의 형태를 설정하기 위해 액화 공중합체, 예를 들어 폴리-DL-락티드-코-글리콜리드 50:50, 80 mg/ml의 메틸렌 클로라이드로 코팅된다.

[0163] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 지지체는 생체적합성 및 생분해성 형태 설정 물질로 코팅된다. 한 실시양태에서, 형태 설정 물질은 폴리-락티드-코-글리콜리드 공중합체를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 형태 설정 물질은 액화된다.

[0164] 한 다른 측면에서, 본 발명의 지지체는 예를 들어 이식 후에 새로운 조직의 재생을 촉진하기 위해 이식 전에 (중합체 매트릭스 또는 지지체에 세포를 시딩하기 전 또는 후) 첨가제 또는 약물로 처리될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 성장 인자, 사이토킨, 세포외 매트릭스 또는 지지체 성분 및 다른 생활성 물질이 이식편 치유 및 새로운 조직의 재생을 촉진하기 위해 중합체 매트릭스 또는 지지체에 첨가될 수 있다. 상기 첨가제는 일반적으로 적절한 새로운 조직이 이식된 기관 또는 조직에서 형성되는 것을 보장하기 위해서 재건, 대체 또는 증대되는 조직 또는 기관에 따라 선택될 것이다 (뼈 치유를 촉진할 때 사용하기 위한 상기 첨가제의 예에 대해서는 예를 들어 문헌 [Kirker-Head, C. A. Vet. Surg. 24 (5): 408-19 (1995)] 참조). 예를 들어, 중합체 매트릭스 (임의로 내피 세포가 시딩됨)가 혈관 조직을 증대하기 위해 사용될 때, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) (예를 들어, 미국 특허 5,654,273)가 새로운 혈관 조직의 재생을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 성장 인자 및 다른 첨가제 (예를 들어, 성장 인자표피 성장 인자 (EGF), 헤파린-결합 표피-유사 성장 인자 (HBGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 사이토킨, 유전자, 단백질 등)는 첨가되는 세포가 사용될 경우 중합체 매트릭스 상에 시딩된 세포에 의해 생산될 수 있는 상기 성장 인자 (존재할 경우)의 임의의 양을 초과하는 양으로 첨가될 수 있다. 상기 첨가제는 바람직하게는 복구, 대체 또는 증대되어야 하는 조직 또는 기관에 적절한 종류의 새로운 조직의 재생을 촉진하기에 충분한 양으로 제공된다 (예를 들어, 숙주 세포의 이식편 내로의 침윤을 유발하거나 가속화함으로써).

다른 유용한 첨가제는 항균제, 예를 들어 항생제를 포함한다.

[0165] 한 바람직한 지지체 매트릭스 또는 지지체는 세포 지지체가 이식된 후에 짧은 거리에 걸친 영양물질의 확산에 의한 세포 생존을 가능하게 할 수 있는 교차하는 미세섬유로 구성된다. 세포 지지체 매트릭스 또는 지지체는 이식 후에 세포 질량의 증가와 함께 혈관화된다.

[0166] 이식 전에 시험관 내에서 3차원 구조체 구조물의 제조는 생체 내에서 이식 후에 세포의 궁극적인 최종 분화를 용이하게 하게 하고, 매트릭스에 대한 염증 반응의 위험을 최소화하고, 따라서 이식편 구축 및 수축을 방지한다.

[0167] 중합체 매트릭스 또는 지지체는 사용 전에 임의의 공지의 방법을 사용하여 멸균될 수 있다. 사용되는 방법은 중합체 매트릭스에 사용되는 물질에 따라 결정된다. 멸균 방법의 예는 스팀, 건열, 방사선, 기체, 예를 들어 에틸렌 옥시드, 기체 및 비등 멸균을 포함한다.

[0168] 지지체를 구성하는 합성 물질은 예를 들어 용매 캐스팅, 압축 성형, 필라멘트 연신, 메쉉 (meshing), 침출 (leaching), 제직 (weaving) 및 코팅과 같은 방법을 사용하여 성형될 수 있다. 용매 캐스팅에서, 적절한 용매, 예를 들어 메틸렌 클로라이드 내의 하나 이상의 중합체의 용액이 분지 패턴 경감 구조로서 캐스팅된다. 용매 증발 후에 박막이 얻어진다. 압축 성형에서, 중합체는 30,000 파운드/제곱인치 이하의 압력에서 적절한 패턴으로 압축된다. 필라멘트 연신은 용융 중합체로부터의 연신을 수반하고, 메쉉은 섬유를 펠트 (felt) 유사 물질로 압축함으로써 메쉬를 형성하는 것을 수반한다. 침출에서, 2개의 물질을 함유하는 용액이 구조물의 최종 형태에 근접한 형태로 펼쳐진다. 이어서, 용매를 사용하여 성분 중의 하나를 용해시켜 세공을 형성한다 (본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,514,378 (Mikos) 참조). 핵 형성에서, 지지체 형태의 박막은 방사선 손상 물질의 트랙 (track)을 생성하는 방사성 분열 생성물에 노출된다. 이어서, 폴리카르보네이트 시트를 산 또는 염기로 에칭하여, 방사선 손상 물질의 트랙을 세공으로 전환시킨다. 마지막으로, 레이저를 사용하여 균일한 세공 크기를 갖는 구조체를 형성하기 위해 많은 물질을 통해 개별적인 구멍을 성형할 수 있다. 코팅은 중합체 구조체를 그의 기계적 특성을 변경하기 위해, 예를 들어 액화 공중합체 (폴리-DL-락티드-코-글리콜리드 50:50, 80 mg/ml의 메틸렌 클로라이드)와 같은 물질로 코팅하거나 침투시키는 것을 나타낸다. 코팅은 요구되는 기계적 특성이 달성될 때까지 단층 또는 다중층으로 수행될 수 있다. 상기 성형 기술은 조합하여 사용될 수 있고, 예를 들어 중합체 매트릭스 또는 지지체는 제직되고, 압축 성형되고, 함께 접착될 수 있다. 또한, 상이한 공정에 의해 성형된 상이한 중합체 물질은 함께 연결되어 복합 형태를 형성할 수 있다. 복합 형태는 판상 구조체일 수 있다. 예를 들어, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 하나 이상의 중합체 매트릭스에 부착되어 다층 중합체 매트릭스 또는 지지체 구조체를 형성할 수 있다. 부착은 액체 중합체로 접착하거나 봉합함으로써 수행될 수 있다. 또한, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 고체 블록으로 형성되고 레이저 또는 다른 표준 기계 가공 기술에 의해 그의 요구되는 최종 형태로 성형될 수 있다. 레이저 성형은 레이저를 사용하여 물질을 제거하는 과정을 의미한다.

[0169] 바람직한 실시양태에서, 지지체는 부직 폴리클리콜산 (PGA) 펠트 및 폴리(락트산-코-글리콜산) 중합체 (PLGA)로부터 형성된다. 또다른 바람직한 실시양태에서, 지지체는 요로전환 지지체이다.

[0170] 미국 특허 출원 공개 20070276507 (Bertram et al., 그 전부가 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 본 발명의 중합체 매트릭스 또는 지지체는 임의의 수의 전체적인 시스템, 기하 구조 또는 공간 제한을 충족하기 위해 임의의 수의 바람직한 입체형태로 성형될 수 있다. 매트릭스는 얇은 막으로 구성된 관강 기관 또는 조직 구조체의 치수 및 형태에 일치하도록 성형된 3차원 매트릭스일 수 있다. 예를 들어, 방광 재건을 위한 중합체 매트릭스의 사용에서, 방광의 전체 또는 일부의 치수 및 형태에 일치하도록 성형된 3차원 매트릭스가 사용될 수 있다. 물론, 중합체 매트릭스는 상이한 크기로 성형될 수 있고, 상이한 크기의 환자의 방광에 일치하도록 성형된다. 임의로, 중합체 매트릭스는 그의 생분해 후에 생성되는 재건된 방광이 천연 방광과 유사한 방식으로 비게 될 때 접힐 수 있도록 성형되어야 한다. 또한, 중합체 매트릭스는 환자의 특수한 요구를 수용하도록 다른 방식으로 성형될 수도 있다. 예를 들어, 이전에 다치거나 또는 장애가 생긴 환자는 상이한 복강을 가질 수 있고, 방광 대체 지지체, 방광 증대 지지체, 방광 도관 지지체, 및 적합하도록 적용된 배뇨근 상당 지지체를 필요로 할 수 있다.

[0171] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 평활근 세포 집단에 사용하기 적합한 추가의 지지체를 고려한다. 예를 들어, 폐 내에 이식하기 적합한 지지체가 제공될 수 있다.

[0172] A. 증대 또는 대체 지지체

[0173] 다른 한 측면에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 방광의 일부에 일치하도록 성형된다. 한 실시양태에서, 성

형된 매트릭스는 수여자의 존재하는 방광의 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%를 대체하도록 일치하게 된다. 다른 한 측면에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 방광의 100% 또는 전부에 일치하도록 성형된다.

[0174] 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 2개의 별개의 표면을 갖는 제1 이식가능한, 생체적합성, 합성 또는 천연 중합체 매트릭스 또는 지지체, 및 적어도 2개의 별개의 표면을 갖는 제2 이식가능한, 생체적합성, 합성 또는 천연 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함하고, 상기 2개의 별개의 표면은 서로 짝짓도록 조정되고, 짝지을 때 치료를 필요로 하는 관강 기관 또는 조직 구조체의 적어도 일부에 일치하도록 성형된다. 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 2개 이상의 별개의 부분으로 하위 분할되는 하나의 통합 단위로부터 또는 짝짓도록 조정된 2개 이상의 별개의 부분으로부터 형성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 짝지은 후 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 관강 기관 또는 조직 구조체의 재건, 복구, 증대, 또는 대체를 위해 사용될 수 있다.

[0175] 몇몇 실시양태에서 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 대칭인 반면, 다른 실시양태에서 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 비대칭이다. 한 실시양태에서, 제1 중합체 매트릭스 또는 지지체는 닫힌 돔형 말단 및 열린 적도 경계부를 갖는 반구형 또는 준-반구형 형상을 갖고, 제2 중합체 매트릭스 또는 지지체는 제1 중합체 매트릭스의 적도 경계부와 짝짓도록 조정된 고리 (collar)이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 각각, 닫힌 돔형 말단 및 열린 적도 경계부를 갖는 반구형 또는 준-반구형 형상이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 각각 원형 또는 반-원형 기부 (base) 및 각각의 기부로부터 방사상으로 신장하는 적어도 2개의 꽃잎부 (petal)를 포함한다. 본 실시양태에서, 제1 및 제2 중합체 매트릭스의 기부 및 꽃잎부 성형된 부분은, 짝지어진 중합체 매트릭스의 한 면에 폭이 넓어지는 길이방향 타원형 개구부가 생성되고 길이방향 개구부에 대향하는 면에 원형 개구부가 생성되도록, 속이 빈 구형 또는 준-구형 매트릭스 또는 지지체를 생성하도록 짝지어진다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 중합체 매트릭스는 짝짓도록 조정된 상부, 전면 및 측면부를 포함하는 3개의 부분으로 이루어진다. 본 실시양태에서, 3개의 별개의 부분은 적어도 3개, 바람직하게는 4개의 수직 솔기를 사용하여 짝지어지고, 이에 의해 왕관형의 네오-방광 구조물을 형성한다. 왕관형의 구조물은 바람직하게는 관강 기관 재건, 복구, 증대, 또는 대체를 위한 장치로서 단독으로 사용된다. 한 실시양태에서, 구조물은 방광 증대 지지체이다. 방광 증대 지지체의 일례가 도 1에 도시되어 있다. 또 다른 실시양태에서, 구조물은 방광 대체 지지체이다. 방광 대체 지지체의 한 예를 도 2에 도시한다.

[0176] 추가로, 제1 중합체 매트릭스, 제2 중합체 매트릭스, 또는 둘 모두는 천연 용기 또는 관에 대한 구조물의 연결이 필요한 관형 용기 또는 삽입체 (insert)를 수용하도록 조정된 적어도 하나의 수용기 또는 포트를 포함할 수 있다. 용기 또는 삽입체 자체는 예를 들어 원통형 중합체의 제1 단부에 위치한 적어도 하나의 테두리 (flange)를 각각 갖는 원통형 또는 관형 성형된 중합체 매트릭스이다. 용기 또는 삽입체는 바람직하게는 상기 설명된 제1 또는 제2 중합체 매트릭스와 동일한 생체적합성 물질로 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 용기 또는 삽입체는 또한 원통형 또는 관형 용기 또는 삽입체 중합체 매트릭스 둘레에 맞도록 조정된 와셔를 함유한다. 예를 들어, 와셔는 히드로겔이다. 원통형 또는 관형 용기 또는 삽입체는 임의로 와셔를 함유할 수 있다. 와셔는 히드로겔일 수 있다. 추가로, 원통형 또는 관형 삽입체는 자가-안정화될 수 있다.

[0177] 또 다른 실시양태에서, 천연 용기 또는 관에 대한 지지체 또는 매트릭스 (세포가 시딩된 것)의 연결이 필요한 관형 용기 또는 삽입체를 수용하도록 조정된 수용기 또는 포트가 또한 아래에서 논의되는 다른 매트릭스에 적용된다.

[0178] B. 요로 전환체

[0179] 본 발명은 대상체에서 요로전환체의 제작에서 세포로 시딩되고 위장관 조직에 대한 대체물로서 사용될 수 있는 네오-요로전환 또는 도관 지지체를 제공한다. 예를 들어, 본원에서 설명되는 네오-요로 전환체는 그렇지 않으면 회장 루프 전환을 할 환자의 치료를 위해 근치적 방광적출술 후에 적용될 수 있다.

[0180] 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 방법으로부터 형성된, 그를 필요로 하는 대상체 내의 요로전환체로서 사용하기 위해 적합한 도관 지지체 또는 매트릭스를 고려한다. 도관 지지체의 하나의 말단은 하나 이상의 수뇨관에 연결될 수 있고, 다른 말단은 대상체의 신체 외부에 있는 소변 저장기에 연결될 수 있다. 한 실시양태에서, 도관은 스토마를 통해 대상체의 신체에서 나올 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 관상 형태로 제공된 제1 이식가능한, 생체적합성, 합성 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 관형 지지체는 대상체의 수뇨관에 연결되도록 구성된 제1 말단을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 지지체는 대상체에서 스토마 또는 괄약근을 형성하도록 구성된 제2 말단을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 지지체는 적어도 하나의 수뇨관에 연결되도록 구성된 적어도 하나의 측면 개구부를 추가로 포함한다.

몇몇 실시양태에서, 제1 지지체는 제1 수뇨관에 부착하도록 구성된 제1 측면 개구부 및 제2 수뇨관에 부착되하도록 구성된 제2 측면 개구부를 포함한다.

[0181] 하나의 다른 실시양태에서, 관형 구조체는 균등한 가장자리를 포함하는 제1 말단 및 비-균일한 또는 불균등한 가장자리를 포함하는 제2 말단을 포함한다. 비-균일한 가장자리는 기부로부터 방사상으로 신장하는 많은 꽃잎부를 가진 원형 기부를 포함할 수 있다. 꽃잎부의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개일 수 있다. 불균등한 가장자리는 예를 들어 도 3에 도시된 것과 같은 일련의 꽃잎부를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 관형 구조체는 그를 필요로 하는 환자에서 요로전환 시스템 또는 도관으로서 사용하기 적합한 형태를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 시스템은 예를 들어 수뇨관루 조성술의 경우에서와 같이 소변을 하나 이상의 수뇨관으로부터 복벽부로 전환시킨다. 다른 실시양태에서, 시스템은 예를 들어 방광루 조성술 (cystostomy)의 경우에서와 같이 소변을 방광으로부터 복벽부로 전환시킨다. 하나의 다른 실시양태에서, 시스템은 방광을 요도에 연결한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 시스템은 소변을 하나 이상의 수뇨관으로부터 복벽부로 전환시킬 수 있고, 제2 시스템은 소변을 방광으로부터 복벽부로 전환시킬 수 있다. 모든 실시양태에서, 시스템은 예를 들어 스토마의 형성에서와 같이 소변을 하나 이상의 수뇨관으로부터 복벽부로 전환시킬 수 있다.

[0182] 또 다른 실시양태에서, 관형 매트릭스 또는 지지체는 요로 전환 또는 도관 지지체이다.

[0183] 한 실시양태에서, 요로전환 시스템의 관형 구조체는 직사각형, 원형 또는 삼각형 단면을 갖는다. 도 3a는 본원에서 고려되는 상이한 단면 입체형태의 몇몇을 예시한다.

[0184] 또 다른 실시양태에서, 관형 구조체는 이식 후에 효능을 유지하기에 충분한 강성을 보유한다. 하나의 다른 실시양태에서, 관형 구조체의 강성은 그의 관강 내에 카테터를 사용하여 또는 그를 사용하지 않으면서 보유된다. 카테터가 사용되는 경우에, 이는 추가의 효능을 제공하기 위해 관형 구조체의 관강 공간 내에 위치할 수 있다.

[0185] 하나의 다른 실시양태에서, 도관 지지체는 제1 지지체의 제1 말단을 수뇨관에 연결하도록 구성된 원형 또는 타원형 커넥터 (connector) 형태의 제2 지지체를 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 도관 지지체는 대상체에서 스토마를 생성하기 위해 제1 관형 지지체의 제2 말단과 스토마 또는 괄약근을 형성하도록 구성된 와셔 고리의 형태의 제3 지지체를 추가로 포함할 수 있다. 도 3b는 요로 전환 구조물의 변이를 예시한다 (A - 열린 클레임 타원형; B - 열린 클레임 타원형 수용기; C - 닫힌 타원형 수용기 및 3개의 관).

[0186] 몇몇 실시양태에서, 관형 구조체는 비실금형 스토마 또는 괄약근의 생성을 위한 문합을 달성하기 위해 조직, 기관 또는 신체 부위에 대한 연결을 위한 와셔 구조체를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 두께가 약 1 ㎜ 미만, 약 1.5 ㎜ 미만, 약 2 ㎜ 미만, 약 2.5 ㎜ 미만, 약 3 ㎜ 미만, 약 3.5 ㎜ 미만, 약 4 ㎜ 미만, 약 4.5 ㎜ 미만, 또는 약 5 ㎜ 미만인 와셔가 제공된다.

[0187] 한 실시양태에서, 요로전환 또는 도관 지지체는 도 3에 도시된 입체형태로 성형된다.

[0188] 하나의 다른 실시양태에서, 관형 구조체는 균등한 가장자리를 포함하는 제1 말단 및 비-균일한 또는 불균등한 가장자리를 포함하는 제2 말단을 포함한다. 비-균일한 가장자리는 대상체의 외부에 스토마를 형성하는 것과 같이 대상체의 외부 영역에 대한 부착을 위해 구성된 하나 이상의 패스너 (fastener)를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 관형 구조체의 제1 및 제2 말단은 도 3에 예시된 형태일 수 있다. 패스너의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개일 수 있다.

[0189] 또 다른 실시양태에서, 관형 지지체는 도 27에 도시된 형태이다.

[0190] 도 4A는 인간 비뇨계에 대한 정상 해부학의 일부를 도시한 것이다.

[0191] 한 실시양태에서, 관형 구조체는 그를 필요로 하는 환자에서 요로전환체 또는 도관으로서 사용하기 적합한 형태를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 도관은 예를 들어 수뇨관루 조성술의 경우에서와 같이 소변을 하나 이상의 수뇨관으로부터 복벽부로 전환시킨다 (도 4D). 다른 실시양태에서, 도관은 예를 들어 방광루 조성술의 경우에서와 같이 소변을 방광으로부터 복벽부로 전환시킨다 (도 4B). 하나의 다른 실시양태에서, 도관은 방광을 요도에 연결한다 (도 4D). 또 다른 실시양태에서, 제1 도관은 소변을 하나 이상의 수뇨관으로부터 복벽부로 전환시킬 수 있고, 제2 도관은 소변을 방광으로부터 복벽부로 전환시킬 수 있다. 모든 실시양태에서, 도관은 소변을 하나 이상의 수뇨관으로부터 복벽부로 전환시킬 수 있다 (도 4B). 모든 실시양태에서, 도관은 스토마를 형성하도록 구성될 수 있다.

[0192] 한 실시양태에서, 요로전환 또는 도관 지지체의 관형 구조체는 직사각형, 원형 또는 삼각형 단면 영역을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 관형 구조체는 이식 후에 효능을 유지하기에 충분한 강성을 보유한다. 하나의

다른 실시양태에서, 관형 구조체의 강성은 그의 관강 내에 카테터를 사용하여 또는 그를 사용하지 않으면서 보유된다. 몇몇 실시양태에서, 요로전환 지지체는 이식 시에 관형 구조체의 관강 공간에 위치하도록 구성된 카테터를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 카테터는 폴리 (Foley)-유사 벌룬 (balloon) 카테터이다. 카테터가 사용되는 경우에, 이는 추가의 효능을 제공하기 위해 관형 구조체의 관강 공간 내에 위치할 수 있다. 당업자는 당업계에 공지된 다른 카테터가 본 발명에서 사용하기 적합할 수 있음을 알 것이다.

[0193] 또 다른 실시양태에서, 지지체의 관형 벽의 두께는 약 2 ㎜ 미만, 약 2.5 ㎜ 미만, 약 3.5 ㎜ 미만, 약 4 ㎜ 미만, 약 4.5 ㎜ 미만, 약 5 ㎜ 미만, 약 5.5 ㎜ 미만 또는 약 6 ㎜ 미만일 것이다.

[0194] 일부 실시양태에서, 지지체는 가변성인 외부 및 내부 직경을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 지지체의 끝은 나팔 형태로 퍼지거나, 퍼지지 않거나, 밀봉되어 있거나 원형이다.

[0195] 다른 실시양태에서, 지지체는 소변이 투과할 수 있다. 한 실시양태에서, 지지체의 공극 크기는 약 0 마이크로미터 내지 약 500 마이크로미터 초과이다. 또 다른 실시양태에서, 공극 크기는 약 100 마이크로미터 내지 약 200 마이크로미터이다. 또 다른 실시양태에서, 공극 크기는 약 150 마이크로미터 내지 약 200 마이크로미터이다. 다른 실시양태에서, 공극 크기는 약 100 마이크로미터, 약 110 마이크로미터, 약 120 마이크로미터, 약 130 마이크로미터, 약 140 마이크로미터, 약 150 마이크로미터, 약 160 마이크로미터, 약 170 마이크로미터, 약 180 마이크로미터, 약 190 마이크로미터 또는 약 200 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 공극 크기는 약 100 마이크로미터, 약 200 마이크로미터, 약 300 마이크로미터, 약 400 마이크로미터, 약 500 마이크로미터 또는 약 600 마이크로미터이다. 다른 실시양태에서, 지지체는 단일 공극 크기 분포, 다중 공극 크기 분포 또는 공극 구배 분포인 공극 구조를 포함한다.

[0196] 또 다른 실시양태에서, 지지체 물질은 봉합가능(suturable)하고, 내누출성이 있는 조직으로 연결을 형성할 수 있다.

[0197] 다른 실시양태에서, 관형 지지체 물질은 이식 사용, 지지 세포 부착 및 숙주 조직의 내성장(in-growth) 시간 전체에 걸쳐 개방성을 유지하고, 신축성을 유지하도록 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 물질은 정상 생체내 유체 순환 동안에 노출될 수 있는 압력을 초과하는 파열 강도를 가질 것이다. 다른 실시양태에서, 물질은 숙주 조직 내성장에 상응하는 분해 시간을 가질 것이다.

[0198] C. 근육 등가물

[0199] 한 측면에서, 본 발명의 중합체 매트릭스 또는 지지체는 근육 등가 지지체이다. 한 실시양태에서, 근육 등가 지지체는 배뇨근 등가물 지지체이다. 또 다른 실시양태에서, 지지체는 복강경 이식에 적합하다.

[0200] 한 측면에서, 중합체 매트릭스는 상기 처리가 필요한 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 들어맞고 복강경 이식되기에 충분한 크기로 성형된 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 중합체 매트릭스 또는 지지체는 길이가 약 3 내지 약 20 cm이다. 한 실시양태에서 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 길이가 약 20 cm이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 길이가 약 15 cm이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 길이가 약 10 cm이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 길이가 약 8 cm이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 길이가 약 4 cm이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 길이가 약 3 cm이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 중합체 매트릭스 또는 지지체는 폭이 약 1 내지 약 8 cm이다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 폭이 약 4 cm이다. 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 폭이 약 3 cm이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 최대 폭이 약 5 cm이다.

[0201] 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 3차원 (3-D) 형상을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 편평한 형상을 갖는다. 한 실시양태에서, 편평형 중합체 매트릭스 또는 지지체는 보다 신축성이 되도록 전처리된 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 전처리된 영역은 주름지게 되는 영역에서 코팅된다. 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 롤링(rolling)되거나, 접히거나 그렇지 않으면 복강경 관 및/또는 포트를 통한 이식을 위해 형상화되도록 충분히 변형가능하다. 이러한 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 풀리거나, 펼쳐지거나 그렇지 않으면 복강경 관 및/또는 포트를 통하여 다음 삽입을 형성하기 위해 되돌려지도록 충분히 변형가능하다. 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 복강경 관 및/또는 포트를 통하여 이식 전에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 스트립으로 절단된다. 특정 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 스트립은 복강경 튜브 및/또는 포트를 통하여 이식 전에 메

이팅(mating)된다. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 스트립은 접착제, 스테이플, 봉합사 또는 통상의 당업자에게 공지된 다른 기법을 이용하여 메이팅될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 메이팅된 스트립은 복강경 튜브 및/또는 포트를 통해 통과하도록 접히고/거나 쌓인다. 이러한 실시양태에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 스트립은 복강경 관 및/또는 포트를 통하여 삽입 후 펼쳐지고/거나 무너뜨려진다. 일부 실시양태에서, 이전에 배치된 메이팅 수단은 복강경 관 및/또는 포트를 통하여 적절한 다음 삽입으로서 조여진다.

[0202] 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 패치 형태 또는 스트립 형태로 제공되는 제1 이식가능, 생체적합성, 합성 또는 천연 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함한다. 한 실시양태에서, 패치는 필요한 환자의 방광에 배뇨근 등가물로 사용하기에 적합한 형태를 갖는다. 한 다른 실시양태에서, 패치는 필요한 환자의 기존 방광의 부피 용량을 증가시키는데 적합한 형태를 갖는다. 특정 실시양태에서, 패치는 약 50 mL 내지 약 500 mL 만큼 방광 크기를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 패치는 50 mL의 증분으로 방광 크기를 증가시킬 것이다. 일부 실시양태에서, 패치는 약 450 mL 만큼 방광 크기를 증가시킨다. 한 실시양태에서, 30 ㎠의 표면적 증가는 200 mL 방광의 부피를 250 mL로 늘린다. 또 다른 실시양태에서, 25 ㎠의 증가는 350 mL 방광의 부피를 400 mL로 늘린다. 한 실시양태에서, 지지체는 약 30 ㎠의 2차원 표면적을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 지지체는 약 25 ㎠의 2차원 표면적을 갖는다. 한 실시양태에서, 패치는 스트립, 디스크, 정사면체, 타원체 형태 또는 임의의 다른 적절한 형태이다. 다른 실시양태에서, 패치는 미리 접혀진 형태, 예를 들어 아코디언 형태와 유사하게 제공된다.

[0203] 도 5a-b는 근육 등가 지지체 또는 중합체 매트릭스의 예를 보여준다. 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 이중 웨지(double wedge), 예를 들어 도 5a에 나타낸 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 도 6-9에 나타낸 형태 중 하나로 성형된다.

[0204] 모든 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 방광 및 매트릭스 또는 지지체 모두의 압박을 최소로 하도록 성형된다.

[0205] 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 패치 형태로 또는 스트립 형태로 제공되는 제1 이식가능, 생체적합성, 합성 또는 천연 중합체 매트릭스 또는 지지체를 포함한다. 한 실시양태에서, 패치는 필요한 환자의 방광에 배뇨근 등가물로 사용하기에 적합한 형태를 갖는다. 한 다른 실시양태에서, 패치는 필요한 환자의 기존 방광의 부피 용량을 증가시키기에 적합한 형태를 갖는다. 일부 실시양태에서, 패치는 50 mL의 증분으로 방광 크기를 증가시킬 것이다. 한 실시양태에서, 패치는 스트립, 디스크, 정사면체, 타원체 형태 또는 임의의 다른 적절한 형태이다. 다른 실시양태에서, 패치는 미리 접혀진 형태, 예를 들어 아코디언과 같은 형태와 유사하게 제공된다.

[0206] 한 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 도 1 내지 9 또는 27에 나타낸 형태 중 하나로 성형된다.

[0207] 모든 실시양태에서, 이들 매트릭스 또는 지지체에 사용된 생체적합성 물질은 예를 들어 생분해성이다. 모든 실시양태에서, 생체적합성 물질은 폴리글리콜산일 수 있다.

[0208] 모든 실시양태에서, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 생체적합성이고 생분해성인 형태 설정 물질로 코팅된다. 한 실시양태에서, 형상 설정 재료는 액체 공중합체를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 액체 공중합체는 액화된 락티드/글리콜리드 공중합체를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 액체 공중합체는 폴리-DL-락티드-코-글리콜리드를 포함할 수 있다.

[0209] 5. 구조물

[0210] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 세포 군집으로 시딩된 하나 이상의 중합체 지지체 또는 매트릭스를 제공한다. 세포 군집으로 시딩된 이러한 지지체는 본원에서 "구조물"로서 지칭될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포-시딩된 중합체 매트릭스 또는 매트릭스들은 방광 대체 구조물, 방광 증진 구조물, 방광 도관 구조물 및 배뇨근 등가물 구조물로 이루어진 군으로부터 선택되는 네오-방광 구조물을 형성한다.

[0211] 당업자는 본원에 기재된 하나 이상의 세포 군집의 시딩 또는 침착이 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 생물반응기 인큐베이션 및 배양 (문헌 [Bertram et al. U.S. Published Application 20070276507]; 맥올리스터(McAllister) 등의 미국 특허 제7,112,218호; 오거(Auger) 등의 미국 특허 제5,618,718호; 니클라슨(Niklason) 미국 특허 제6,537,567호); 압력-유도 시딩 (문헌 [Torigoe et al. (2007) Cell Transplant., 16(7):729-39]; [Wang et al. (2006) Biomaterials. May; 27(13):2738-46]); 및 정전기 시딩 (볼린(Bowlin) 등의 미국 특허 제5,723,324호)이 사용될 수 있다. 또한, 세포의 에어로졸로 전자회전 섬유(electrospun fiber)를 동시에 코팅하는 최근 기술이 시딩 또는 침착에 적합할 수 있다 (문

헌 [Stankus et al. (2007) Biomaterials, 28:2738-2746]).

[0212] 한 실시양태에서, 세포의 침착은 세포 부착 증진 단백질과 지지체를 접촉시키는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 증진 단백질은 피브로넥틴, 콜라겐 및 매트리겔(MATRIGEL)™ 중 하나 이상이다. 한 다른 실시양태에서, 지지체는 세포 부착 증진 단백질이 없다. 또 다른 실시양태에서, 세포의 침착은 지지체와 세포 군집의 접촉 후 배양 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 배양은 생물반응기에서 펄스형 및/또는 정상 흐름으로 컨디셔닝하는 것을 포함할 수 있다.

[0213] 이어서 본원에 기재된 바와 같이 지방 혈액 또는 말초 혈액으로부터 분리된 평활근 세포 군집을 본원에 기재된 지지체 상에 시딩할 수 있다.

[0214] 다음은 지지체 상에 세포를 시딩하기 위한 프로토콜의 대표적인 예이다. 지방- 또는 말초 혈액 유래의 평활근 세포는 지지체를 시딩하는데 요구되는 세포의 수량을 생성하기 위해 최대 7 주 동안 증식시킬 수 있다. 지지체를 시딩하는데 적합한 세포의 밀도는 아래 기재된다. 지방 유래 평활근 세포는 구조물을 생성하기 위해 지지체의 시딩을 위한 세포의 수확 전 2 기간 동안 증식시킬 수 있다. 말초 혈액 유래의 평활근 세포 배양물은 지지체 시딩을 위한 수확 전 P3-4로 증식시킬 수 있다. 세포 시딩을 위한 지지체를 제조하기 위해, 적합한 물질(예를 들어, PGA 펠트(felt))을 크기로 자르고, 적절한 형상으로 봉합하고, 물질 (예를 들어, PLGA)로 코팅할 수 있다. 이어서 지지체를 적합한 방법 (예를 들어, 에틸렌 옥시드)을 사용하여 멸균할 수 있다. 세포 시딩 전 날, 멸균된 지지체를 연속적으로 60% 에탄올/40% D-PBS, 100% D-PBS, D-MEM/10% FBS 또는 α-MEM/10% FBS로 포화시켜 예비 습윤화시키고 이후 실온에서 밤새 D-MEM/10% FBS 또는 α-MEM/10% FBS에서 인큐베이션한다. 이어서 지지체를 지방-, 또는 말초 혈액 유래의 평활근 세포로 시딩하고 대상체에 이식될 때까지 (예를 들어, 7일까지) 시딩된 구조물을 가습화된 37℃ 인큐베이터에서 5% $CO_2$에서 숙성시킨다. 당업자는 세포의 시딩을 위한 지지체를 제조하는 또 다른 방법 및 지지체 상에 세포를 시딩하는 또 다른 방법을 인지할 것이다.

[0215] 한 측면에서, 본 발명은 구조물의 이식을 기다리는 대상체에게 유리한 감소된 시간 프레임으로 구조물을 제조하는 방법을 제공한다. SVF로부터 유래된 분화되지 않은 지방 줄기 세포가 평활근 세포로 분화되기 전 6주 동안 유도 배지 내에서 인큐베이션되어야 한다는 것은 보고되어 있다 (문헌 [Jack et al. 2009 *supra*]). 한 실시양태에서, 방법은 a) 인간 지방 조직 샘플을 획득하는 단계; b) 샘플로부터 완전히 분화된 평활근 세포 군집을 분리하는 단계; c) 세포 군집을 배양시키는 단계; 및 d) 세포 군집을 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 단계 a), b), c) 및 d)는 약 45일 이내로 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 분리 단계는 세포 선택 없이 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 분리 단계 b)는 획득 단계 a) 이후 약 72시간 이내로 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 배양 단계 c)는 약 4주 이내로 수행된다. 다른 실시양태에서, 접촉 단계 d)는 약 10일 이내로 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 단계 a), b), c) 및 d)는 약 28일 이내로 수행된다. 한 다른 실시양태에서, 분리 단계 b)는 획득 단계 a) 이후 약 48시간 이내에 수행된다. 한 실시양태에서, 배양 단계 c)는 약 2주 이내로 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 접촉 단계 d)는 약 5일 이내로 수행된다. 모든 실시양태에서, 인간 지방 조직 샘플은 자가조직 공급원으로부터 획득한다. 한 다른 실시양태에서, 방법은 추가로 평활근 세포 마커의 발현을 검출하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 발현은 mRNA 발현이다. 추가 실시양태에서, 발현은 폴리펩티드 발현이다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드 발현은 세포내 면역형광에 의해 검출된다.

[0216] 한 실시양태에서, 지지체는 본원에 기재된 바와 같은 세포 군집을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 지지체는 본원에 기재된 바와 같은 세포 군집으로 본질적으로 이루어진다. 한 다른 실시양태에서, 지지체는 본원에 기재된 바와 같은 세포 군집으로 구성된다.

[0217] 제1 중합체 매트릭스 또는 존재하는 경우 제2 중합체 매트릭스 또는 둘 모두는 제1 중합체 매트릭스의 제1 표면, 제2 중합체 매트릭스의 제1 표면 또는 둘 모두 상에 또는 내에 침착된 하나 이상의 세포 군집을 포함하여 세포가 있는 매트릭스 또는 지지체의 구조물을 형성하며, 여기서 하나 이상의 세포 군집은 실질적으로 근육 세포 군집을 포함한다. 근육 세포 군집은 예를 들어 평활근 세포 군집이다. 바람직한 실시양태에서, 제1 표면 및 제2 표면은 각각 제1 및 제2 중합체 매트릭스의 외측 표면이다.

[0218] 또 다른 실시양태에서, 매트릭스 및 세포를 함유하는 구조물은 임의의 다른 세포 군집이 없다. 바람직한 실시양태에서, 구조물은 요로상피 세포가 없다.

[0219] 이러한 구조물은 필요한 대상체에게, 예를 들어, 방광, 수뇨관 및 요도를 비롯하여 비뇨생식기 기관과 같은 관강 기관 또는 조직 구조를 제공하는데 사용된다. 대상체는 이러한 기관 또는 조직의 재구축, 복구, 증진 또는

대체를 필요로 할 수 있다. 한 실시양태에서, 관강 기관 또는 조직 구조는 방광 또는 그의 일부이고, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 매트릭스 표면 상에 침착된 평활근 세포를 갖는다. 구조물은 또한 요로 전환 또는 도관 또는 배뇨근 등가물을 제공하는데 사용될 수 있다.

[0220] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 세포 군집으로 시딩된 요로 전환 또는 도관 지지체 또는 매트릭스를 제공한다. 세포 군집으로 시딩된 이러한 지지체는 본원에서 "구조물"로 지칭될 수 있다. 한 실시양태에서, 요로 전환 또는 방광 도관 구조물은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 지지체로 구성되고 세포 군집은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 지지체의 하나 이상의 표면 상에 침착된다.

[0221] 한 측면에서, 본 발명은 필요한 대상체에게, 예를 들어 방광을 비롯하여 비뇨생식기 기관과 같은 기존 관강 기관 또는 조직 구조를 개선하는데 사용될 수 있는 근육 등가 구조물을 제공한다. 대상체는 이러한 기관 또는 조직의 확대 또는 처리를 필요로 할 수 있다. 한 실시양태에서, 관강 기관 또는 조직 구조는 방광 또는 그의 일부이고, 중합체 매트릭스 또는 지지체는 매트릭스의 표면 상에 침착된 평활근 세포를 갖는다. 한 실시양태에서, 구조물은 배뇨근 등가물을 제공하는데 사용된다.

[0222] 당업자는 매트릭스 또는 지지체 상에 세포 군집을 침착시키기 위한 여러 적합한 방법이 있다는 것을 인지할 것이다.

[0223] 한 측면에서, 구조물은 새로운 기관 또는 조직 구조를 필요로 하는 대상체에게 이식하는데 적합하다. 한 실시양태에서, 구조물은 시토카인 MCP-1을 생성하는 세포의 군집을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, MCP-1은 이식 부위에 대상체 또는 수령체의 천연 중간엽 줄기 세포의 이동을 유도한다. 한 실시양태에서, 이동하는 수령체 천연 중간엽 줄기 세포는 새로운 기관 또는 조직 구조의 재생을 돕는다.

[0224] 한 다른 측면에서, 본 발명은 특정 세포 밀도로 세포로 시딩된 지지체를 제공한다. 한 실시양태에서, 지지체는 약 $20\times10^6$ 내지 약 $30\times10^6$개 세포의 세포 밀도로 평활근 세포 군집으로 시딩된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 밀도는 약 $1\times10^6$ 내지 약 $40\times10^6$, 약 $1\times10^6$ 내지 약 $30\times10^6$, 약 $1\times10^6$ 내지 약 $20\times10^6$, 약 $1\times10^6$ 내지 약 $10\times10^6$ 또는 약 $1\times10^6$ 내지 약 $5\times10^6$이다.

[0225] 추가 실시양태에서, 밀도는 약 $20\times10^6$ 내지 약 $98\times10^6$개의 세포이다. 또 다른 추가 실시양태에서, 밀도는 약 $21\times10^6$ 내지 약 $97\times10^6$, 약 $22\times10^6$ 내지 약 $95\times10^6$, 약 $23\times10^6$ 내지 약 $93\times10^6$, 약 $24\times10^6$ 내지 약 $91\times10^6$, 약 $25\times10^6$ 내지 약 $89\times10^6$, 약 $26\times10^6$ 내지 약 $87\times10^6$, 약 $28\times10^6$ 내지 약 $85\times10^6$, 약 $29\times10^6$ 내지 약 $83\times10^6$, 약 $30\times10^6$ 내지 약 $80\times10^6$, 약 $35\times10^6$ 내지 약 $75\times10^6$, 약 $40\times10^6$ 내지 약 $70\times10^6$, 약 $45\times10^6$ 내지 약 $65\times10^6$ 또는 약 $50\times10^6$ 내지 약 $60\times10^6$이다. 바람직한 실시양태에서, 밀도는 약 $24\times10^6$ 내지 약 $91\times10^6$개의 세포이다.

[0226] 또 다른 실시양태에서, 밀도는 약 $2.5\times10^6$ 내지 약 $40\times10^6$, 약 $5\times10^6$ 내지 약 $40\times10^6$, 약 $7.5\times10^6$ 내지 약 $35\times10^6$, 약 $10\times10^6$ 내지 약 $30\times10^6$, 약 $15\times10^6$ 내지 약 $25\times10^6$ 및 약 $17.5\times10^6$ 내지 약 $22.5\times10^6$이다. 또 다른 실시양태에서, 세포 밀도는 약 $1\times10^6$, 약 $2\times10^6$, 약 $3\times10^6$, 약 $4\times10^6$, 약 $5\times10^6$, 약 $6\times10^6$, 약 $7\times10^6$, 약 $8\times10^6$, 약 $9\times10^6$, 약 $10\times10^6$, 약 $11\times10^6$, 약 $12\times10^6$, 약 $13\times10^6$, 약 $14\times10^6$, 약 $15\times10^6$, 약 $16\times10^6$, 약 $17\times10^6$, 약 $18\times10^6$, 약 $19\times10^6$, 약 $20\times10^6$, 약 $21\times10^6$, 약 $22\times10^6$, 약 $23\times10^6$, 약 $24\times10^6$, 약 $25\times10^6$, 약 $26\times10^6$, 약 $27\times10^6$, 약 $28\times10^6$, 약 $29\times10^6$, 약 $30\times10^6$, 약 $31\times10^6$, 약 $32\times10^6$, 약 $33\times10^6$, 약 $34\times10^6$, 약 $35\times10^6$, 약 $36\times10^6$, 약 $37\times10^6$, 약 $38\times10^6$, 약 $39\times10^6$, 약 $40\times10^6$, 약 $41\times10^6$, 약 $42\times10^6$, 약 $43\times10^6$, 약 $44\times10^6$, 약 $45\times10^6$, 약 $46\times10^6$, 약 $47\times10^6$, 약 $48\times10^6$, 약 $49\times10^6$, 약 $50\times10^6$, 약 $51\times10^6$, 약 $52\times10^6$, 약 $53\times10^6$, 약 $54\times10^6$, 약 $55\times10^6$, 약 $56\times10^6$, 약 $57\times10^6$, 약 $58\times10^6$, 약 $59\times10^6$, 약 $60\times10^6$, 약 $61\times10^6$, 약 $62\times10^6$, 약 $63\times10^6$, 약 $64\times10^6$, 약 $65\times10^6$, 약 $66\times10^6$, 약 $67\times10^6$, 약 $68\times10^6$, 약 $69\times10^6$, 약 $70\times10^6$, 약 $71\times10^6$, 약 $72\times10^6$, 약 $73\times10^6$, 약 $74\times10^6$, 약 $75\times10^6$, 약 $76\times10^6$, 약 $77\times10^6$, 약 $78\times10^6$, 약 $79\times10^6$, 약 $80\times10^6$, 약 $81\times10^6$, 약 $82\times10^6$, 약 $83\times10^6$, 약 $84\times10^6$, 약 $85\times10^6$, 약 $86\times$

$10^6$, 약 $87\times10^6$, 약 $88\times10^6$, 약 $89\times10^6$, 약 $90\times10^6$, 약 $91\times10^6$, 약 $92\times10^6$, 약 $93\times10^6$, 약 $94\times10^6$, 약 $95\times10^6$, 약 $96\times10^6$, 약 $97\times10^6$, 약 $98\times10^6$ 또는 약 $99\times10^6$이다.

[0227] 추가 측면에서, 본 발명은 지지체의 ㎠당 특정 세포 밀도로 세포로 시딩된 지지체를 제공한다. 한 실시양태에서, 밀도는 약 3,000개 세포/㎠ 내지 약 15,000개 세포/㎠, 약 3,500개 세포/㎠ 내지 약 14,500개 세포/㎠, 약 4,000개 세포/㎠ 내지 약 14,000개 세포/㎠, 약 4,500개 세포/㎠ 내지 약 13,500개 세포/㎠, 약 5,000개 세포/㎠ 내지 약 13,000개 세포/㎠, 약 4,500개 세포/㎠ 내지 약 13,500개 세포/㎠, 약 5,000개 세포/㎠ 내지 약 13,000개 세포/㎠, 약 5,500개 세포/㎠ 내지 약 12,500개 세포/㎠, 약 6,000개 세포/㎠ 내지 약 12,000개 세포/㎠, 약 6,500개 세포/㎠ 내지 약 11,500개 세포/㎠, 약 7,000개 세포/㎠ 내지 약 11,000개 세포/㎠, 약 7,500개 세포/㎠ 내지 약 10,500개 세포/㎠, 약 8,000개 세포/㎠ 내지 약 10,000개 세포/㎠, 약 7,500개 세포/㎠ 내지 약 9,500개 세포/㎠ 또는 약 8,000개 세포/㎠ 내지 약 9,000개 세포/㎠이다. 바람직한 실시양태에서, 밀도는 약 3,000개 세포/㎠ 내지 약 7,000개 세포/㎠ 또는 약 9,000개 세포/㎠ 내지 약 15,000개 세포/㎠이다.

[0228] 한 측면에서, 본 발명의 구조물은 이식 후 대상체에게 특정 기능을 제공하도록 조정된다. 한 실시양태에서, 구조물은 이식 후 대상체에게 재생을 제공하도록 조정된다. 또 다른 실시양태에서, 구조물은 이식 부위에서 대상체 내 재생을 촉진하도록 조정된다. 예를 들어, 이식 후, 이식 부위에서 구조물 자체로부터 재생된 조직이 형성될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 구조물은 이식 후 대상체에게 기능적 속성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 요로 전환 구조물은 제1 수뇨관 (예를 들어, 제1 측면 개방부)으로부터 관형 지지체의 내부로 대상체의 소변이 통과하도록 조정될 수 있고/있거나 대상체로부터 나오는 소변의 일시적 저장 및 통과 (예를 들어, 관형 지지체)를 제공하도록 조정된다. 한 실시양태에서, 요로 전환 구조물은 이식 시에 상피화 점막을 제공하도록 조정될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 구조물은 대상에서 새로운 기관 또는 조직 구조의 항상성이 조절된 발생을 제공하도록 조정될 수 있다.

[0229] 6. <u>사용 방법</u>

[0230] 한 측면에서, 본 발명은 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조를, 치료를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법을 포함한다. 한 실시양태에서, 대상체는 기관 또는 조직의 재건, 복구, 증대 또는 대체를 필요로 할 수 있다. 한 실시양태에서, 방법은 기관 또는 조직 구조를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 성형된 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하는 단계를 포함한다. 제공 단계 이후에, 재건, 복구, 증대 또는 대체의 대상인 기관 또는 조직 구조로부터 유래되지 않은 적어도 하나의 세포 집단을 침착시킬 수 있다. 침착 단계는 중합체 매트릭스 상에서의 세포 집단의 배양을 포함할 수 있다. 구조물을 제공하기 위해 매트릭스 상에 세포 집단을 침착시킨 후에, 원하는 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조의 형성을 위해 이를 환자의 치료 부위에 이식할 수 있다. 한 실시양태에서, 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조는 방광이거나 또는 방광의 일부이다.

[0231] 한 다른 측면에서, 본 발명은 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조를, 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은, a) 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 성형된 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하는 단계; b) 새로운 기관 또는 조직 구조에 상응하는 본래적 기관 또는 조직으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 침착시키는 단계; 및 c) 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조의 형성을 위해 상기 대상체에게 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물을 이식하는 단계를 포함한다. 한 다른 측면에서, 본 발명은 네오-방광 또는 그의 일부를, 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 a) 방광 또는 그의 일부에 맞도록 성형된 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하는 단계; b) 대상체의 방광으로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 침착시키는 단계; 및 c) 네오-방광 또는 그의 일부의 형성을 위해 대상체에게 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물을 이식하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법의 단계 b)의 세포 집단은 평활근 세포 마커에 대하여 양성인 수축성 기능을 갖는 하나 이상의 말초 혈액-유래 평활근 세포를 함유하거나, 또는 단계 b)의 세포 집단은 평활근 세포 마커에 대하여 양성인 수축성 기능을 갖는 하나 이상의 지방 조직-유래 평활근 세포를 함유한다. 한 다른 실시양태에서, 세포 집단의 수축성 기능은 칼슘-의존적이다.

[0232] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 혈관증식이 허용되도록, 이식된 도관 구조물을 대상체의 그물막, 장간막, 근육 근막 및/또는 복막으로 랩핑하는 단계를 추가로 포함한다.

[0233] 한 다른 측면에서, 본 발명은 결함성 방광을 위한 요로 전환체 또는 도관을 이를 필요로 하는 대상체에게 제공

하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 요로 전환체를, 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법은 (a) 생체적합성 도관 지지체를 제공하는 단계; (b) 상기 지지체의 제1 영역에 또는 그 위에 제1 세포 집단을 침착시키는 단계 (상기 제1 세포 집단은 실질적으로 근육 세포 집단임); 및 (c) 단계 (b)의 지지체를 상기 대상체에게 이식하여 소변이 대상체로부터 배출되도록 하는 도관을 형성하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 생체적합성 물질은 생분해성이다. 다른 실시양태에서, 생체적합성 물질은 폴리글리콜산이다. 또 다른 실시양태에서, 제1 세포 집단은 실질적으로 평활근 세포 집단이다.

[0234] 한 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 요로 전환 또는 도관 지지체를 제공하는 단계를 포함한다. 다른 추가적 실시양태에서, 요로 전환 또는 도관 지지체는 본원에 기재된 바와 같이 다발성 부분, 예컨대 제1, 제2 및 제3 지지체에 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 결함성 방광으로부터 유래되지 않은 세포 집단을 침착시켜 요로 전환 또는 도관 구조물을 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 한 다른 실시양태에서, 침착 단계는 지지체 상에서의 세포 집단의 배양을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 요로 전환 구조물을, 이를 필요로 하는 환자에게 이식하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이식은 결함성 방광 부위에서 행해진다.

[0235] 한 실시양태에서, 구조물의 개구 단부 (예를 들면, 복벽에 연결되도록 구성된 제1 단부)는 복부 또는 치골상 벽을 통해 피부에 합류되어 (누설치술), 스토마 또는 괄약근을 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 카테터는 스토마 개구를 통하여 구조물의 관강 안으로 삽입되어 소변 유출을 제공한다.

[0236] 도 10은 이식된 도관 구조물의 구성을 예시한다.

[0237] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 요로 전환 구조물의 이식 후 폐색의 유무에 대하여 도관을 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 폐색은 배설물의 축적에 의해 야기될 수 있다. 방법은, 폐색이 검출된 경우, 도관의 관강으로부터 배설물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0238] 한 측면에서, 본 발명은 요로 전환체를, 이를 필요로 하는 대상체에게 일시적으로 제공한다. 한 실시양태에서, 일시적 요로 전환 또는 도관 구조물은 대상체에게 이식되어 스토마 개구부를 형성하고, 카테터 또는 다른 장치가 스토마를 통해 도관 구조물의 관강으로 일시적으로 삽입된다. 일시적 도관은 소변이 대상체로부터 배출되도록 하면서 동시에 결함성 방광에 대하여 영구적 해결이 시도되도록 하는 장점을 제공한다. 예를 들면, 도관 구조물의 이식은 세포 집단이 시딩된 네오-방광 구조물의 이식 이전에, 이후에 또는 그와 동시에 수행될 수 있다 (예를 들면 문헌 [Bertram et al. supra] 참조). 도 11은 일시적 요로 전환 구조물의 이식된 성분의 예를 보여준다.

[0239] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 혈관증식이 허용되도록, 이식된 요로 전환 또는 도관 구조물을 대상체의 그물막, 장간막, 근육 근막 및/또는 복막으로 랩핑하는 단계를 추가로 포함한다.

[0240] 한 측면에서, 본 발명은 요로 전환체를 이를 영구적으로 필요로 하는 대상체에게 제공한다. 도 12는 영구적 요로 전환 구조물의 이식된 성분의 예를 보여준다.

[0241] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 구조물은 전립선 요도 대체 및 요로 전환술에 사용될 수 있다. 이러한 절차는 라디칼 전립선 절제술을 필요로 하는 대상체에서 전립선 요도를 제거하기 위해 필요하다. 다른 실시양태에서, 구조물이 경피 전환 튜브에 사용되어 밸브-유사 킹크를 갖는 콘티넌트(continent) 튜브를 형성시킬 수 있다. 추가적 실시양태에서, 구조물이 방광경부 수술에 사용되는 방광경부 슬링 및 랩핑 물질 및 콘티넌트 채널 또는 도뇨관삽입용 개구부를 갖는 비뇨기 출구로서 사용될 수 있다. 이러한 실시양태의 예는 도 13에 도시된다.

[0242] 한 측면에서, 본 발명의 요로 전환 구조물은 상피화 점막을 제공한다. 한 실시양태에서, 구조물이 채택되어 이식시 상피화 점막을 형성한다. 한 실시양태에서, 상피화 점막은 전정 영역 및 점막피부 영역을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 전정 영역은 점막피부 영역에 인접한다. 또 다른 실시양태에서, 점막피부 영역은 대상체의 피부 및 복벽에 연결된 구조물의 스토마 끝에 위치한다. 일반적으로, 천연-발생 점막피부 영역은 점막 및 피부 스킨의 존재를 특징으로 하며, 전형적으로 몸체의 내측을 커버한 외부 피부 끝 및 점막이 출발하는 몸체의 오리피스 근처에 존재한다. 본 발명의 방법 및 구조물에 의해 제공되는 상피화 점막은 대상체로의 이식 후 요로 전환 구조물의 제1 말단에서 발전된다. 추가의 실시양태에서, 상피화 점막은 전정 영역에서 먼저 나타나 구조물의 스토마 말단으로 향하여 점막피부 영역을 통해 점진적으로 팽창 또는 증가하는 상피의 존재를 특징으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 상피는 상피성 세포 마커의 발현을 특징으로 한다. 추가의 실시양태에서, 상피성 세포 마커는 시토케라틴이다. 시토케라틴은, 시토케라틴 1 내지 19를 비제한적으로 포함하는 당업계에 공지된 시토케라틴 중 하나 이상일 수 있다. 한 다른 실시양태에서, 시토케라틴은 AE-1/AE3 항체로 검출가능하다.

[0243] 확대시키고자 하는 기관 또는 조직으로의 지지체의 이식은 실시예에 기재된 방법에 따라 또는 당업계에 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 매트릭스 또는 지지체는 표적 기관에 이식편 물질을 봉합함으로써 대상체의 기관 또는 조직에 이식될 수 있다.

[0244] 기재된 기술은, 치료를 필요로 하는 환자에서 기존의 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조를 팽창시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 기존의 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조는, 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 형성화되며 복강경적으로 이식하기에 충분한 크기를 갖는 중합체 매트릭스 또는 지지체를 제공하고, 상기 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 기관 또는 조직 구조로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 침착시키고; 기존의 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조가 팽창되도록, 상기 환자의 상기 치료 부위에, 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경적으로 이식함으로써 확대시킬 수 있다.

[0245] 도 7e는 본원에 기재된 근육 등가 지지체의 이식을 위한 가능한 외과수술 방법을 도시한다. 도 7f는 빈 방광 및 가득 찬 방광 상의 이식 부위를 도시한다. 도 7g는 표면의 절단시 만들어지는 타원체를 보여주는 외과적 슬릿을 갖는 방광 모델을 도시한다. 플라스틱 튜브는, 접히거나 롤링된 본 발명의 중합체 매트릭스 또는 지지체를 통과하기 위해 사용가능한 제한된 공간의 모델로서 사용될 수 있다.

[0246] 기재된 기술은 또한, 치료를 필요로 하는 환자에서 방광 체적 용량을 증가시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 방광 체적 용량은, 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 형상화되고, 복강경적으로 이식되기에 충분한 크기를 갖는 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고; 상기 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 상기 기관 또는 조직 구조로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 침착시키고; 방광 체적 용량이 증가되도록, 상기 환자의 상기 치료 부위에, 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경적으로 이식함으로써 증가시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 매트릭스 또는 지지체는 방광 체적 용량을 약 50 mL 증가시키기에 적합하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 매트릭스 또는 지지체는 방광 체적 용량을 약 100 mL 증가시키기에 적합하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 매트릭스 또는 지지체는 방광 체적 용량을 약 60, 약 70, 약 80 또는 약 90 mL 증가시키기에 적합하다.

[0247] 상기 기술은 치료를 필요로 하는 환자에서 방광 절개부 부위를 팽창시키는데 추가로 사용될 수 있다. 예를 들면, 방광 절개부 부위는, 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 형상화되고, 복강경적으로 이식되기에 충분한 크기를 갖는 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고; b) 상기 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 상기 기관 또는 조직 구조로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 침착시키고; c) 방광 절개부 부위가 팽창되도록, 상기 환자의 상기 치료 부위에, 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경적으로 이식함으로써 팽창시킬 수 있다.

[0248] 본 발명의 또 다른 비제한적인 용도는 요실금 치료를 필요로 하는 환자에서의 요실금 치료 방법을 포함한다. 예를 들면, 상기 치료를 필요로 하는 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 형상화되고, 복강경적으로 이식되기에 충분한 크기를 갖는 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하고; 상기 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 기관 또는 조직 구조로부터 유래되지 않은 자가 세포 집단을 침착시키고; 방광 체적 용량이 증가하도록, 상기 환자의 상기 치료 부위에, 성형된 중합체 매트릭스 구조물을 복강경적으로 이식함으로써 요실금을 치료할 수 있다.

[0249] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 지지체, 세포 집단, 및 방법은 본원에 기재된 장애의 치료에 유용한 의약의 제조를 위해 또한 사용될 수 있다. 장애는 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조의 재생, 재건, 복구, 증대 또는 대체를 필요로 하는 대상체에서의 임의의 상태를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 기관 또는 조직 구조는 방광이거나 또는 방광의 일부이다.

[0250] 또 다른 실시양태에서, 이식된 구조물 상에 침착된 세포는 MCP-1을 생성하고, 이를 이식 부위에서 방출하고, 이는 본래적 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 자극하여 이식 부위를 이동시킨다. 한 다른 실시양태에서, 본래적 MSC는 이식 부위에서 이식된 구조물의 재생을 촉진 및/또는 증강시킨다.

[0251] 한 실시양태에서, 침착된 세포 집단은 본원에 기재된 바와 같이 말초 혈액 또는 지방 조직으로부터 유래된 평활근 세포 (SMC) 집단이다. 또 다른 실시양태에서, SMC 집단은 수축성 기능을 가지며, 평활근 세포 마커, 예컨대 마이오카딘, 알파-평활근 액틴, 칼포닌, 미오신 중쇄, BAALC, 데스민, 근섬유모세포 항원, SM22, 및 그의 임의의 조합물에 대하여 양성인 적어도 하나의 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, SMC 집단은 마이오카딘 (MYOCD) 발현을 입증하는 적어도 하나의 세포를 포함한다. MYOCD 발현은 MYCOD 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 또

는 MYOCD 폴리펩티드의 발현일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, SMC의 수축성 기능은 칼슘-의존적이다. 한 실시양태에서, 재건, 복구, 증대 또는 대체의 대상인 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조는 방광이거나 또는 방광의 일부이다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 요로상피 세포를 포함하지 않는다.

[0252] 모든 실시양태에서, 본 발명의 방법은 본원에 기재된 바와 같이 세포 집단으로 시딩된 방광 대체 지지체, 방광 증대 지지체, 방광 도관 지지체, 또는 배뇨근 등가 지지체를 기재로 하는 이식용 구조물을 이용한다.

[0253] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조의 재생, 재건, 복구, 증대 또는 대체를 위한 방법은 a) 치료를 필요로 하는 관강 기관 또는 조직 구조의 적어도 일부에 맞도록 성형된 생체적합성 합성 또는 천연 중합체 매트릭스를 제공하는 단계; b) 상기 중합체 매트릭스의 제1 영역에 또는 그 위에 제1 세포 집단을 본원에 기재된 세포 밀도로 침착시키는 단계 (상기 제1 세포 집단은 실질적으로 근육 세포 집단임); 및 c) 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조의 형성을 위해 상기 환자의 상기 치료 부위에, 성형된 중합체 매트릭스 세포 구조물을 이식하는 단계를 포함한다. 한 다른 실시양태에서, 생체내 형성된 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조는 천연 방광 조직의 순응을 나타낸다.

[0254] 한 다른 측면에서, 본 발명은 생체역학 자극 또는 사이클링에 근거하여, 네오-방광의 재생을 필요로 하는 대상체로의 이식 후 네오-방광의 재생 방법을 제공한다. 한 측면에서, 방법은 방광 또는 방광의 일부의 증대 또는 대체를 위하여 이식된, 이식된 네오-방광 구조물의 재생을 촉진하는데 사용하기에 적합하다. 한 실시양태에서, 네오-방광 구조물은 네오-방광 매트릭스 또는 지지체 상에 세포를 시딩함으로써 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 네오-방광 지지체는 방광 대체 지지체, 방광 증대 지지체, 방광 도관 지지체, 또는 배뇨근 등가 지지체이다.

[0255] 한 측면에서, 본 발명의 방법은 네오-방광 지지체에 적어도 하나의 세포 집단을 시딩함으로써 형성한 이식된 네오-방광 구조물에 적용된다. 한 실시양태에서, 세포-시딩된 중합체 매트릭스 (또는 매트릭스들)는 방광 대체 지지체, 방광 증대 지지체, 방광 도관 지지체, 또는 배뇨근 등가 지지체이다. 한 실시양태에서, 적어도 하나의 세포 집단은 실질적으로 근육 세포 집단을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 근육 세포 집단은 평활근 세포 집단일 수 있다. 시딩을 위한 세포의 상이한 밀도가 본원에 기재된 바와 같이 적절할 수 있다.

[0256] 한 측면에서, 본 발명의 방법은 네오-방광의 이식 후 상이한 시간에 및 상이한 기간 동안 수행된다. 한 실시양태에서, 사이클링은 일 단위로 기간에 걸쳐, 주 단위로 기간에 걸쳐 또는 격주로 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 일일 사이클링 요법의 기간은 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 5 주, 약 6 주, 약 7 주, 약 8 주, 약 9 주, 약 10 주, 약 11 주, 약 12 주, 약 13 주, 약 14 주, 또는 14 주 초과이다.

[0257] 한 실시양태에서, 대상체를 위한 일일 사이클링 프로토콜은 네오-방광을 약 1시간 동안 채우는 단계, 채워진 네오-방광을 약 1시간 동안 배출시키는 단계 및 네오-방광이 자유롭게, 전형적으로는 밤새 배출하도록 하는 단계를 포함할 수 있다. 이 프로토콜은 대상체에서 사이클링 요법 중 한 날에 수행될 수 있다. 이러한 일일 순서는 첫째 날 이후 수많은 연속적 날 동안 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 사이클링 프로토콜은 매일 수행될 수 있고, 이때 채움 단계의 기간이 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 또는 약 4시간 초과로 증가된다. 또 다른 실시양태에서, 채움 및 배출 단계는 매일 1회 초과로 반복될 수 있고, 이후 네오-방광이 자유롭게 배출하도록 한다.

[0258] 또 다른 실시양태에서, 대상체는 이식 후 카테터 삽입되고, 사이클링 시간이 대상체 카테터의 클램핑 및 클램핑 풀기에 의해 조절된다.

[0259] 당업자는 본원에서 추가적 사이클링 요법이 예상된다는 것을 알 것이다.

[0260] 사이클링 프로토콜의 예는 다음과 같다. 본원에 기재된 바와 같이 네오-방광 매트릭스 또는 지지체에 세포를 시딩함으로써 형성한 네오-방광 구조물을 이식한 후, 이식 후 대략 1 개월부터 출발하여 대략 90 일까지 계속적으로 매 2 주 (14 ± 2 일 간격) 마다 사이클링을 수행할 것이다. 사이클링은 특정 유형의 평가, 예컨대 이식된 네오-방광의 순응 측정 이후, 그러나 다른 유형의 평가 예컨대 형광투시 영상화 이전에 완료될 것이다. 사이클링은 10-25 ml/분의 속도로 순응 측정의 완료 후에 방광을 멸균 염수 (인큐베이터에 의해 가온됨)로 재팽창시킴으로써 수행할 것이다. 사이클링은 적어도 5-10 회 반복할 것이다. 0-10 mmHg의 출발 압력이 달성될 것이고, 출발 시간과 함께 기록될 것이다. 시간, 전달된 등장성 용액의 부피, 및 수득된 압력이 각 주기에 대하여 카테터 주변에서 누출이 관찰되는 시간 (누출점이라도 공지됨)에, 또는 전달된 체적이, 수행된 순응 측정의 체적과 동등한 때 중, 어느 것이든 우선적으로 나타나는 시점에, 기록될 것이다.

[0261] 한 실시양태에서, 본 발명은 (a) 이식된 네오-방광에 유체를 채우는 단계; (b) 단계 (a)의 채워진 네오-방광을

비우는 단계를 포함하는, 대상체에서 이식된 네오-방광의 재생을 촉진하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 단계 (a) 및 (b)를 반복하는 단계 (c)를 포함한다. 한 다른 실시양태에서, 방법은 이식 후 첫 두 주 내에 시작된다. 한 실시양태에서, 단계 (a) 및 (b)는 일일 1회, 주 1회 또는 격주 1회로 수행된다. 일부 다른 실시양태에서, 채움 단계 (a)는 약 1시간 동안 수행되고, 비움 단계 (b)는 약 1시간 동안 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 단계 a) 및 b)는 이식 후 적어도 약 6 주까지 수행된다. 한 다른 실시양태에서, 단계 a) 및 b)는 이식 후 약 10 주 초과로 수행되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 단계 a) 및 b)는 이식 후 약 10 주 초과로 수행된다. 다른 실시양태에서, 채움은 네오-방광을 팽창시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 재생은, 사이클링을 거치지 않은 대상체에서의 네오-방광과 비교시 네오-방광의 용량 증가를 포함한다. 한 다른 실시양태에서, 재생은 사이클링을 거치지 않은 대상체에서의 네오-방광과 비교시 네오-방광의 순응 증가를 포함한다. 다른 실시양태에서, 재생은 사이클링을 거치지 않은 대상체에서의 네오-방광과 비교시 네오-방광에서의 세포외 매트릭스 성장 증가를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포외 매트릭스 성장의 증가는 엘라스틴 섬유의 성장을 포함한다.

[0262] 한 다른 측면에서, 본 발명은 이식된 네오-방광이 수령체의 필요에 응답하도록 표유동물에서의 네오-방광의 항상성 조절 발달의 제공 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이식된 네오-방광은 수령체에 비례하는 크기로 성장한다. 또 다른 실시양태에서, 대상체에서의 네오-방광의 항상성 조절 발달의 제공 방법은 (a) 생체적합성 중합체 지지체를 제공하는 단계; (b) 상기 지지체의 제1 영역에 또는 그 위에 제1 세포 집단을 침착시키는 단계 (상기 제1 세포 집단은 실질적으로 근육 세포 집단임); 및 (c) 단계 (b)의 지지체를 상기 대상체에게 이식하여 항상성 조절 발달을 확립시키는 단계를 포함한다. 한 다른 실시양태에서, 항상성 조절 발달은 기관 크기 및 구조의 회복을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항상성 조절 발달은 체중에 비례하는 네오-방광 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 비례적 네오-방광 용량은 이식 후 약 4 개월에 달성된다. 또 다른 실시양태에서, 대상체에서의 네오-방광의 항상성 조절 발달의 제공 방법은 이식된 네오-방광의 항상성 조절 발달 또는 진전의 상태를 모니터링하는 단계를 포함한다. 모니터링은 이식된 네오-방광의 위치와 형상을 보여주는 방광조영술 절차, 및/또는 요역학 순응 및 용량의 측정을 포함할 수 있다.

[0263] 또 다른 측면에서, 본 발명은 새로운 기관 또는 조직 구조의 이식 후 환자의 예후 평가 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 상기 대상체로부터 수득한 시험 샘플에서 MCP-1 발현 수준을 검출하는 단계; (b) 대조군 샘플에 대한 MCP-1 발현 수준 (또는 대조군 참조값)에 대하여 시험 샘플에서의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) MCP-1 발현 수준의 측정을 기준으로 하여 환자에서의 재생적 예후를 예측하는 단계 (여기서, 대조군 샘플 (또는 대조군 참조값)과 비교하여, 시험 샘플에서의 MCP-1의 더 높은 수준의 발현은 대상체에서의 재생에 대한 예후임)를 포함한다.

[0264] 또 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 환자의 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 및 (b) 생물학적 샘플에서 MCP-1 발현을 검출하는 단계 (여기서 MCP-1 발현은 환자에서의 재생에 대한 예후임)를 포함하는, 환자에의 새로운 기관 또는 조직 구조의 이식 후 환자의 예후 평가 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플 (또는 대조군 참조값)에 대한, 환자의 생물학적 샘플에서의 증가된 MCP-1 발현은 대상체에서의 재생에 대한 예후이다. 일부 실시양태에서, 대조군 샘플 (또는 대조군 참조값)에 대한, 환자의 샘플에서의 감소된 MCP-1 발현은 대상체에서의 재생에 대한 예후가 아니다. 환자의 샘플은 채액, 예컨대 혈액 또는 소변을 포함하는 시험 샘플일 수 있다.

[0265] 일부 실시양태에서, 측정 단계는 (i) 시험 샘플 및 대조군에서의 상이한 수준의 MCP-1 발현을 측정하고/거나; (ii) 시험 샘플 및 대조군에서의 상이한 수준의 MCP-1 발현의 측정으로부터 얻어진 데이터를 분석하기 위한 목적에 적합한 프로세서에 의해 실행되는 소프트웨어 프로그램의 사용을 포함한다. 적합한 소프트웨어 및 프로세서는 당업계에 익히 공지되어 있으며, 시중에서 입수가능하다. 프로그램은 실체형 매체 예컨대 CD-ROM, 플로피 디스크, 하드 드라이브, DVD, 또는 프로세서 관련 메모리 상에 저장된 소프트웨어에서 실행될 수 있지만, 당업자는 전체 프로그램 또는 그의 일부가 대안적으로 프로세서 이외의 장치에 의해 실행되고/거나 펌웨어 및/또는 전용 하드웨어에서 익히 공지된 방식으로 실행될 수 있음을 쉽게 알 것이다.

[0266] 측정 단계 이후, 전형적으로는 측정 결과, 발견, 진단, 예측 및/또는 치료 권고가 기록되고, 예를 들어, 기술자, 전문의 및/또는 환자에게 전달된다. 특정 실시양태에서, 컴퓨터를 사용하여 상기 정보를, 관심을 갖는 당사자, 예컨대, 환자 및/또는 담당의에게 전달할 것이다. 일부 실시양태에서는, 검정 결과 또는 진단이 전달될 국가 또는 관할 지역과 다른 국가 또는 관할 지역에서 검정이 수행되거나 검정 결과가 분석될 수 있다.

[0267] 바람직한 실시양태에서, 상이한 수준의 MCP-1 발현을 갖는 시험 대상체에서 측정된 MCP-1 발현을 근거로 한 예후, 예측 및/또는 치료 권고는, 검정이 완료되고 예후 및/또는 예측이 이루어진 후 가능한 빨리 대상체에게 전

달된다. 결과 및/또는 관련 정보는 대상체의 치료 전문의에 의해 대상체에게 전달될 수 있다. 대안적으로, 결과는 기록, 전자 형태의 통신, 예컨대 이메일, 또는 전화를 포함하는 임의의 통신 수단에 의해 시험 대상체에게 직접 전달될 수 있다. 통신은, 예컨대 이메일 통신의 경우, 컴퓨터를 통해 쉽게 이용할 수 있다. 특정 실시양태에서, 예후 시험의 결과 및/또는 시험에 근거한 치료 권고 및/또는 그로부터 도출된 결론을 포함하는 통신은 원거리 통신의 당업자에게 친숙한 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어를 병용하여 대상체에게 자동적으로 생성 및 전달될 수 있다. 건강관리-관련 통신 시스템의 한 예가 미국 특허 6,283,761에 기재되어 있으나; 본 발명은 상기 특정 통신 시스템을 이용하는 방법에 제한되지 않는다. 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 샘플의 검정, 재생의 예후 및/또는 예측, 및 검정 결과 또는 진단의 전달을 포함하는 방법 단계의 전부 또는 일부는 다양한 (예를 들면, 외국) 관할 지역에서 수행될 수 있다.

[0268] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 예후 방법은 이식의 성공 및 재생에 대한 재활/치료 프로토콜에 관하여 이해관계자에게 정보를 제공한다. 한 실시양태에서, 방법은 상기 대상체로부터 수득한 시험 샘플에서 MCP-1 발현 수준을 검출하는 단계; (b) 대조군 샘플에 대한 MCP-1 발현 수준 (또는 대조군 참조값)에 대하여 시험 샘플에서의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) MCP-1 발현 수준의 측정에 근거하여 환자의 재생적 예후를 예측하는 단계 (여기서 대조군 샘플 (또는 대조군 참조값)과 비교시, 시험 샘플에서의 더 높은 수준의 MCP-1 발현은 새로운 기관 또는 조직 구조의 재생 상태에 대한 지표임)를 포함한다.

[0269] 일반적으로, 본원에서 사용되는 바와 같이, 재생 예후는 하기 중 임의의 하나 이상의 예상 또는 예측을 포함한다: 본원에 기재된 구조물의 이식을 통한 방광 대체 또는 증대 이후 기능적 방광의 발달 또는 개선, 본원에 기재된 구조물의 이식 후 기능적 요로 전환체의 개발, 본원에 기재된 구조물의 이식 후 방광 용량의 증대 또는 향상된 방광 용량, 또는 본원에 기재된 구조물의 이식 후 방광 순응의 진전 또는 향상된 방광 순응.

[0270] 모든 실시양태에서, 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조체의 제공을 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같이 판상으로 조직화된 관강 기관 또는 조직 구조체를 제공하는 방법은 상기된 바와 같이 재생 예후 평가라는 이식 후 단계를 포함할 수 있다.

[0271] 모든 실시양태에서, 본 발명은 특정한 이식 후 모니터링 단계를 포함하는, 새로운 기관 또는 조직 구조체를 필요로 하는 대상체에게 새로운 기관 또는 조직 구조체를 제공하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이식된 구조물의 효과 및 성능이, 예를 들어 초음파 영상화, 신우상 및 이식 후 상이한 시점에서의 소변 및 혈액 분석을 통해 모니터링된다. 이러한 모니터링 단계는 실시예 3-6에 더 상세히 기재된다.

[0272] ## 7. 키트

[0273] 본 발명은 또한 중합체 매트릭스 및 본 발명의 지지체 및 관련 물질 및/또는 세포 배양 배지 및 사용 지침서를 포함하는 키트를 포함한다. 사용 지침서는, 예를 들어 세포의 배양 또는 세포 및/또는 세포 생성물의 투여에 대한 지침을 포함할 수 있다. 사용 지침서는 또한 복강경 이식을 위해 중합체 매트릭스 및 본 발명의 지지체를 전처리(pre-treating), 폴딩 또는 다른 방식으로 제조하는 것에 대한 지침을 포함할 수 있다.

[0274] 한 실시양태에서, 본 발명은, 본원에 기재된 바와 같은 지지체 및 지침서를 포함하는 키트를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 키트의 지지체는, 방광 증진 지지체, 방광 대체 지지체, 요로관 지지체 또는 근육 등가 지지체 중 하나 이상이다.

[0275] ## 8. 보고

[0276] 본 발명의 방법은, 상업적 목적을 위해 실행되는 경우, 일반적으로 재생적 예후의 보고 또는 개요를 제공한다. 본 발명의 방법은 본원에 기재된 구조물을 제공하기 위한 임의의 외과적 절차 전후의 재생의 결과 또는 가능한 과정의 예측을 포함하는 보고를 제공할 것이다. 보고는 예후에 적절한 임의의 지시자에 대한 정보를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법 및 보고는 보고를 데이터베이스에 저장하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 별법으로, 방법은 추가로 대상체에 대한 데이터베이스 내 기록을 생성하고, 데이터로 기록을 채울 수 있다. 한 실시양태에서, 보고는 지면 보고이고, 또 다른 실시양태에서 보고는 청각 보고이고, 또 다른 실시양태에서 보고는 전자 기록이다. 보고는 의사 및/또는 환자에게 제공되는 것이 고려된다. 보고의 수신은 데이터 및 보고를 포함하는 서버 컴퓨터에 대한 네트워크 연결을 확립하고, 데이터 및 보고를 서버 컴퓨터로부터 요청하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 방법은 또한 전부 또는 부분적으로 자동화될 수 있다.

[0277] 하기 실시예는 단지 예시적 목적을 위해 제공된 것이고, 어떠한 방식으로도 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

[0278] 본 명세서에서 인용된 모든 특허, 특허 출원 및 참고 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0279] 실시예

[0280] 실시예 1 - SMC의 공급원으로서의 말초 혈액 및 지방 조직

[0281] **혈액 유래 세포**

[0282] 평활근 세포를 개, 돼지 및 인간 말초 혈액으로부터 성공적으로 단리하였다. 간략하게 설명하면, 인산염 완충 염수 (PBS; 최종 부피 100 mL)를 갖는 말초 혈액 1:1의 50 ml의 희석액을 제조하고, 밀도 구배 물질인 히스토파크(Histopaque) 상에 층상화하고, 실온에서 20분 동안 1,354 xg로 원심분리하였다. 원심분리 후, (상단으로부터 하단까지) 밀도 구배로 4개의 층: 혈청, 백혈구 연층, 히스토파크, 적혈구가 명확히 형성될 것이다. 단핵 세포는 백혈구 연층에 위치하였고, 이는 불투명한 백색/회색 밴드로서 나타났다. 백혈구 연층을 취출하고, 별도의 50 ml의 원추형 튜브로 옮겼다. PBS로 50 mL로 희석하였다. 샘플을 실온에서 10분 동안 711 xg로 원심분리하여 샘플을 펠릿화하였다. 펠릿을 재현탁시키고, 세포를 배양하였다. 후속되는 세포 계대에 의해 적절한 세포 수에 도달될 때, 분취액을, 발현된 평활근 세포 단백질의 면역검출, 평활근 세포 mRNA 전사체의 핵산 검출, 세포 수축, 시토카인 및 효소 합성을 포함한 종점 분석을 위해 고정시키고 처리하였다.

[0283] 결과

[0284] 배지 선택. 40 내지 50 mL의 단일 개 말초 혈액 샘플의 단핵 분획을 6개의 상이한 배지 제제 중에 재현탁시키고, 6-웰 프리마리아(Primaria) 또는 콜라겐-코팅 플레이트에 시딩하였다.

[0285] 도 14A 내지 E에 나타낸 바와 같이, 배양 1주 후에, 소형 점착성 콜로니 및 소형 세포 응집체가 모든 조건에서 관찰되었지만 (DMEM 배지 단리는 나타나지 않음), 세포 유형의 정체는 식별불가능하였다. 알파-MEM + 10% FBS, 모든 동반 보충물을 갖는 EGM-2 배지 및 선택된 동반 보충물을 갖는 (VEGF 및 FGF2 제외) EGM-2에서 성장시 프리마리아 배양 접시에서 (A, C, E), 또한 동일한 배지에서 성장시 조직 배양 플라스틱 플레이트 상에 코팅된 콜라겐 유형 I에서 (B, D, F) 작은 클러스터 및 세포 응집체가 관찰되었다. DMEM 제제에서 성장된 말초 혈액 배양에서 유사한 결과가 나타났다 (데이터는 나타내지 않음).

[0286] 도 15에 나타낸 바와 같이, 배양 2주 후에, 프리마리아 상의 알파-MEM (좌측 패널) 및 콜라겐-코팅 플레이트 (중앙 패널)에서 성장 콜로니 및 작은 단층이 관찰되었다. 형태학적으로, 이들 콜로니는 평활근 (도 15, 상단 패널) 또는 내피 (도 15, 중앙 패널)처럼 보였다. 평활근 (도 15, 상단 패널) 또는 내피 (도 15, 중앙 패널)의 성장 콜로니 형태가 또한 다른 배지/기질 조건에서 형성되었다 (우측 패널). 일부 대식세포는 초기에 알파-MEM에서 유지되었지만 (도 15, 좌측 하단 및 중앙 패널), 후속 계대 내로 도달하지 않았다. 프리마리아 플레이트 상의 10% FBS를 갖는 αMEM에서 단리된 세포는 평활근 (상단 좌측 패널) 또는 대식세포 (하단 좌측 패널) 형태를 가졌다. 이들 조건 하에서는 어떠한 내피 세포도 단리되지 않았다 (중앙 좌측 패널). 콜라겐 I 플레이트 상의 αMEM/10% FBS에서 단리된 세포는 평활근 (상부 중앙 패널), 내피 (중앙 중앙 패널) 및 대식세포 (하단 중앙 패널) 형태를 가졌다. 다른 배지/기질 제제, 예컨대 EGM-2 (상단 우측 패널) 및 20% FBS가 보충된 DMEM (중앙 우측 패널) 또한 중간엽- 및 내피-유사 세포의 성장을 가능하게 하였다.

[0287] 12개의 배지/기질 조건 중, 알파-MEM/10% FBS를 갖는 프리마리아 플레이트는 내피 세포의 성장 콜로니 없이 평활근 세포의 가장 균질한 단리를 함유하였다 (도 15, 상단 좌측 패널). 프리마리아 플레이트 상에서 단리되고 눈클론(Nunclon) 표면 상에서 증식된 세포 (알파-MEM/10% FBS 중)는 평활근 세포 (SMC)에 전형적이고 다른 연구 (문헌 [Kassis et al. (2006)]; [Koerner et al. (2006)]; [Simper et al. (2002)], 상기 참조)에서의 기재와 일치되는 전형적 '골 및 마루(hill and valley)' 형태를 나타냈다.

[0288] 도 16에 나타낸 바와 같이, 이들 세포는 또한 여러 계대에 대하여 이러한 형태를 유지하였다 (도 16A 내지 G). 비교를 위해 돼지 경동맥 SMC (도 16H) 및 개 방광 SMC (도 16I)의 영상을 나타내었다. 보다 늦은 계대 (도 16F, G)에서의 평활근 세포는 보다 크고 보다 많이 확산되었다. 보다 이른 계대 (A 내지 E)는 돼지 경동맥 (H) 및 개 방광 (I)으로부터 단리된 평활근 세포 (SMC)와 유사하였다. 보다 늦은 계대의 평활근 세포 (F, G)는 보다 크고 보다 많이 확산되었으며, 이는 평활근 표현형을 제시하는 것이다.

[0289] **지방 유래 세포**

[0290] 평활근 세포를 하기 절차에 따라 돼지 지방 조직으로부터 단리하였다. 모든 절차는 생물안전 후드에서 수행하였다.

[0291] 지방 샘플을 얻었다. 실온 또는 4℃에서 24시간 이하 동안 저장한 후에 생물안전 용기에서 사용하였다.

[0292] BSA 1 gm 및 PBS 100 ml 당 콜라게나제 0.1 내지 0.3 gm을 첨가하여 콜라게나제 용액을 제조하였다. 0.2 ㎛ 필터 유닛을 통하여 용액을 여과하였다. 37℃로 가온시켰다.

[0293] 지방 부피 당 등부피의 콜라게나제 용액을 각각의 원심분리 병에 첨가하였다. 하나의 조직 부피의 콜라게나제 용액이 요구되었다 (즉, 지방 조직 10 ml 당 콜라게나제 용액 10 ml).

[0294] 튜브를 멸균제로 닦고, 파라필름으로 감싸 덮고, 60분 동안 로커 상에서 37℃ 인큐베이터에 넣었다. 별법으로, 튜브를 37℃ 수조에 넣고, 20분마다 손으로 진탕시켰다.

[0295] 실온에서 5분 동안 300 xg로 원심분리하였다.

[0296] 원심분리기로부터 튜브를 꺼내어 이를 10초 동안 격렬히 진탕시켜 세포를 철저히 혼합하였다. 이는 일차 지방 세포로부터의 기질 세포의 분리를 완성하기 위한 것이었다.

[0297] 다시 5분 동안 300 xg로 원심분리하였다. 주의깊게 상단에서 오일, 일차 지방세포 (부유 세포의 황색 층) 및 콜라게나제 용액을 흡출하였다. 기질-혈관 분획 (하단의 암적색 세포)이 방해받지 않도록 펠릿 위에 갈색 콜라게나제 용액 대략 10 ml를 남겨두었다.

[0298] 세포의 펠릿을 1% BSA를 함유하는 PBS 중에 재현탁시키고, 스테리-플립(Steri-Flip)을 이용하여 여과하였다.

[0299] 5분 동안 300 xg로 세포를 원심분리하고, 남아있는 콜라게나제 용액을 흡출하였다. 흡출시, 피펫의 팁은 오일이 가능한 한 완전히 제거되도록 상단으로부터 흡출되어야 한다. 세포 펠릿은 하단에서 조밀하게 충전되어야 한다.

[0300] 각각의 원심분리관에 조직 배양 배지 10 ml를 첨가하고, 세포를 재현탁시켰다. 하나의 튜브에 세포를 모으고, 다시 원심분리하였다.

[0301] 상청액을 흡출하였다. 세포를 배지 10 ml 중에 현탁시켰다.

[0302] 세포를 동등하게, 또한 그에 따라 적절한 수의 플라스크에 분할하였다. 플레이팅 후 24 내지 72시간에, 플라스크로부터의 배지를 흡출하였다. PBS로 세척하고 흡출하였다.

[0303] 새로운 배지의 플라스크 당 원래의 부피를 첨가하였다.

[0304] 세포는 80 내지 90% 합류(confluence)로 성장되고, 이어서 통과되거나 동결 보존될 것이다.

[0305] 후속되는 세포 계대에 의해 적절한 세포 수에 도달하면, 분취액을, 발현된 평활근 세포 단백질의 면역검출을 위해 고정시키고 처리하였다.

[0306] 도 17은 배양물의 형태학적 평가에 관한 것이다. 형태는 배양물에서 3 내지 5일 후에 평가하였다. 지방 조직으로부터 유래된 인간 및 돼지 세포는 평활근 세포의 형태학적 특징을 나타내었다 (도 17). 세포는 골 및 마루 형태를 나타내었고, 통과시 가늘고 긴 형상의 평평한 섬유모세포-유사 특징과 같은 추가의 특징을 나타내었고, 평행한 열로 신장 및 배열되었고, 성장에 있어 "회전형(whirled)" 외관을 나타내었으며, 이는 배양된 평활근 세포에 대해 전형적인 것이다.

[0307] 평활근 마커. 수축 유전자 (및 그들이 코딩하는 단백질)의 증가된 발현은 SMC 성숙과 관련된다 (문헌 [Jeon et al., J Cell Sci 119, 4994-5005 (2006)]; [Ross et al., J Clin Inves. 116, 3139-3149 (2006)]; [Sinha et al., Am J Physiol Cell Physiol 287, 1560-1568 (2004)]). 마이오카딘은 평활근 수축 단백질을 코딩하는 유전자의 전사 조절제이고, 여기에는 SM22, 알파 평활근 액틴, 평활근 미오신 중쇄 및 칼포닌이 포함된다 (문헌 [Qiu et al. (2005) Circ Res 983-991]; [Wang et al. (2003) Proc Natl Acad Sci 100:7129-7134]; [Yoshida et al. (2003) Circ Res 92:856-864]). 마이오카딘은 평활근 분화를 위해 요구되고, 일부 세포 유형에서 평활근 유전자 발현을 조정하기에 충분하다 (문헌 [Milyavsky et al. (2007) Cancer Cell 11:133-146]; [van Tuyn et al. (2005)] (상기 참조); [Wang et al. (2003)] (상기 참조); [Yoshida et al. (2003)] 상기 참조). 본 발명자들은 전체 RNA를 단리하고 반-정량적 RT-PCR을 수행함으로써 혈액 또는 지방 조직으로부터 단리된 평활근 세포가 평활근 세포 마커 마이오카딘, 평활근 알파 액틴, SM22, 미오신 중쇄 및 칼포닌을 발현하는지를 결정하였다.

[0308] 도 18에 나타낸 바와 같이, 결과는 이들 세포가 유전자 수준에서 모든 이들 평활근 세포 마커를 발현한다는 것

을 보여주었고, 이는 방광 평활근 세포에서 나타나는 평활근 세포 마커와 일치하는 것이다. 이들 데이터는 말초 혈액 또는 지방 조직으로부터 단리된 이들 평활근 세포가 평활근 세포의 특성을 갖는다는 개념을 뒷받침한다.

[0309] 표현형 특성화. 본 발명자들은 이들 말초 혈액 단리된 평활근 세포가 평활근 유전자 발현 뿐만 아니라 특정한 평활근 수축 단백질의 전사 조절제를 발현한다는 것을 이미 보여주었다 (도 18). 도 18은 SMC 마커 마이오카딘, 평활근 알파-액틴, SM22, 평활근 미오신 중쇄 및 칼포닌의 유전자 발현을 위한 RT-PCR 분석을 보여준다. 샘플은 돼지 지방, 말초 혈액 및 방광으로부터 단리된 평활근 세포로부터의 것이었다 (계대 4). 지방 조직으로부터 단리된 SMC는 각 계대 사이에서 3 내지 5일 배양될 수 있었고, 혈액으로부터 단리된 SMC는 제1 계대 전에 14일 동안 또한 이어서 추가의 계대에서 3 내지 5일 배양될 수 있었다. 베타-액틴에 대한 유전자 발현을 겔에 대한 내부 로딩 대조군으로서 이용하였다. 지방 및 말초 혈액 세포 단리물에 대한 발현 프로파일은 방광 SMC의 경우에 필적하였다.

[0310] 도 19는 평활근 세포 발현 단백질 마커를 향한 다양한 항체를 이용하여 수행된 면역형광 염색을 보여준다. 돼지 지방, 말초 혈액 및 방광으로부터 단리된 평활근 세포 내에서 마커 알파-액틴, SM22, 칼포닌 및 평활근 미오신 중쇄를 검사하였다. 이들 단백질은 평활근 세포의 수축 기능에 모두 관여한다. 다중 계대에서의 평활근 세포는 평활근 알파 액틴, SM22, 칼포닌 및 평활근 미오신 중쇄에 대해 양성 염색되었다. 이들 단백질의 하위세포 국소화는 방광 SMC와 비교하여 평활근 세포에서 실질적으로 동일하였다. 세포의 부하 섬유에서 이들 단백질의 상세한 염색이 확인되었다. 이러한 염색 패턴은 평활근 세포에 대해 전형적인 것이고 이에 대해 예상되는 것이다.

[0311] 도 20은 인간 말초 혈액으로부터 단리된 평활근 세포의 면역염색을 보여준다 (계대 5). 평활근 알파 액틴, SM22 및 칼포닌에 대한 프로브를 사용하였다. 평활근 알파 액틴 및 칼포닌에 대한 이중 염색 (상단 우측 패널)은 동일한 세포 내에서의 이들 두 단백질의 동시-발현을 나타내었다. 단일 세포 내의 하나 초과의 평활근 세포 마커의 동시 발현은 추가로 이들 평활근 세포의 개념을 뒷받침한다.

[0312] 수축성. 말초 혈액 유래 평활근 세포가 평활근 수축 단백질을 발현하기 때문에, 본 발명자들은 그의 수축 기능을 평가하기 위해 3차원 겔 수축 검정을 수행하였다. SMC는 3차원 겔 내에 포매되는 경우 자발적으로 콜라겐 매트릭스의 수축을 유도하는 것으로 나타난 바 있다 (문헌 [Travis et al. (2001) Circ Res 88:77-83]). 지방 조직 유래 평활근 세포 또한 수축성에 대하여 시험하였다.

[0313] 도 21은 돼지 혈액 유래 (a) 및 돼지 지방 조직 유래 (b) 세포가 방광 평활근 세포 (c)에 필적하는 정도로 수축함을 보여준다. 혼합물에의 EDTA의 첨가는 수축을 억제하였고, 따라서 이는 수축이 칼슘 의존성 (평활근 세포의 또 다른 특징임)이라는 개념을 뒷받침한다. 이들 데이터는 직경 감소가 수축 세포에 의존하고 세포가 이러한 용량으로 기능함을 나타낸다. 세포를 500,000개 세포/ml로 시딩하였고, 2일 후 콜라겐 겔 직경의 감소에 의해 입증되는 바와 같이 수축이 가능한 것으로 나타났다. 돼지 방광 평활근 세포를 양성 대조군으로서 이용하였다. 이러한 수축의 칼슘 의존성을 입증하기 위해, 칼슘 킬레이트화제 EDTA를 별도의 샘플에 첨가하여 수축을 억제하였다. 이러한 결과로부터 방광 유래 평활근 세포와 유사하게 칼슘-의존적 방식으로 세포가 수축하는 능력을 확인하였다.

[0314] 성장 동력학. 평활근 세포를 세포 요법 응용에서 이용하기 위해, 허용 시간 범위 내에서 필요한 세포 수가 달성될 수 있는지를 결정하는 것이 중요하다. 개 및 돼지 연구로부터의 결과는 평활근 콜로니 (말초 혈액의 40 ml 샘플로부터)가 시딩 후 7일만큼 조기에 관찰될 수 있고, 14일 내에 용이하게 통과될 수 있음을 나타내었다 (도 14 및 15). 하나의 연구에서, 배양 (계대 2의 종결) 18일 후에 1,200,000개의 세포를 얻었고, 이 때 이들을 동결 보존하였다. 이들 특정 세포를 약 50일 후에 해동시키고, 약 80% 합류시 일상적으로 통과시켜 성장 동력학을 결정하였다. 해동 6일 후, 세포 집단은 16,700,000개의 세포로 증식되었다 (계대 3의 종결). 추가로 배양 7일 후, 세포 집단은 31,700,000개의 세포에 도달하였다 (계대 4의 종결). 이 초기 연구에서는 30,000,000개의 세포가 배양 대략 30일째에 달성될 수 있음을 나타내었다.

[0315] 도 22는 세포의 제한된 증식 잠재력에 대한 것이다. 도 22는 단위 면적 당 회수된 세포의 수의 함수로서의 인간 지방 조직으로부터 단리된 평활근 세포의 성장을 보여준다. 이들 데이터는, 계대 4와 5 사이에서, 회수된 세포 수가 하락되기 시작함을 나타내고, 이는 이들 세포가 제한되고 한정된 증식 능력을 갖는다는 개념을 뒷받침하며, 이는 진정 줄기 세포가 아닌 전구 세포의 특징이다.

[0316] 도 23은 계대 당 회수된 세포 수의 함수로서의 돼지 지방성, 말초 혈액 및 방광 평활근으로부터 단리된 평활근

세포의 성장을 보여준다. 도시된 바와 같이, 2 내지 4주의 시간 범위에 걸쳐, 계대 2와 3 사이에서 세포 수의 극적인 증가가 달성되었고, 이는 수백만 세포의 회수를 가능하게 하는 것이다. 이것은 지방 유래 세포의 제한된 또는 한정된 증식 잠재력을 입증한다.

[0317] 증식의 접촉 억제. 말초 혈액 및 지방 조직으로부터 단리된 평활근 세포는 증식의 접촉 억제를 나타내었다. 예를 들어, 도 14 내지 17에 제공된 이들 세포의 형태학적 평가는, 여러 계대에 걸쳐 증식의 접촉 억제의 존재를 입증한다. 세포는 서로 접촉시 증식을 계속하지 않았다. 대조적으로, MSC는 증식의 접촉 억제를 나타내지 않았고, 이들은 형질전환된 세포 배양물에서의 포커스 형성과 유사하게 서로의 상단에 축적되어 나타날 수 있다. 예를 들어, 쥬(Zhou) 등은 마우스 골수의 단핵 세포 분획으로부터의 MSC의 단리 및 배양에 대해 보고하였고, 3개 계대 후 배양된 MSC가 접촉 억제 손실을 나타냄을 관찰하였다 (제10850면 및 도 1A 참조) (문헌 [Cancer Res. 2006; 66(22):10849-10854]).

[0318] 시토카인 MCP-1 생성. MCP-1은 방광 배뇨근 세포의 정상 생성물이다. 대동맥 평활근 세포에서, MCP-1은 재생에 있어 역할을 한다. MCP-1은 단핵 세포를 보충하는 그의 능력에 대해 가장 잘 알려져 있다. 그러나, 이는 케모카인을 초과하는 것이고; 이는 또한 혈관 평활근 세포 증식을 위한 강력한 미토겐이고, 맥관 손상의 영역으로의 단핵구의 순환을 보충한다. 단핵구는 전형적으로, 시토카인 및 성장 인자에 대한 저장소의 역할을 할 수 있는 대식세포로 형질전환된다. 대식세포 및 근육 전구 세포는 MCP-1 신호전달에 대한 양쪽 표적이다. 이 시토카인은 신체 내에서 줄기 및 전구 세포 보충에 관여하며, 이는 잠재적으로 재생 과정에 기여한다.

[0319] 인간 말초 혈액 평활근 세포에 의해 생성된 MCP-1을 정량화하기 위해, R&D 시스템으로부터의 ELISA 기반 검정 시스템을 이용하였다. 배지 샘플을 이중 검정하고, 표준 곡선과 비교하여 MCP-1 수준의 추정치를 얻었고, 이를 ug/24시간/백만 세포로서 기록하였다. 인간 방광 평활근, 지방, 말초 혈액 및 방광 요로상피 (음성 대조군)로부터 단리된 세포에 대한 시토카인 MCP-1의 발현을 측정하였다.

[0320] 도 24는 상기 분석으로부터의 결과가 인간 말초 혈액 유래 및 인간 지방 조직 유래 평활근 세포가 인간 방광 평활근 세포의 경우에 필적하는 수준으로 MCP-1을 생성함을 나타낸다는 것을 보여준다. 이들 데이터는, 방광 SMC와 같이, MCP-1이 지방 및 말초 혈액으로부터 단리된 평활근 세포에 의해 발현된다는 결론을 뒷받침한다. 또한, 이들 데이터는 MCP-1의 생성이, 직접적으로 또는 간접적으로 근육 전구 세포가 구조물 내에서 보충/이동되거나 증식하도록 함으로써, 재생에 있어 핵심적 역할을 할 수 있다는 가정으로 유도한다.

[0321] **논의.** 지방으로부터 단리된 평활근 세포는 여러 평활근 세포 특징을 나타내었다. 본 발명자들의 연구는, 세포가 표준 효소적 소화 및 저속 원심분리 프로토콜을 이용하여 지방으로부터 쉽게 단리될 수 있음을 보여주었다. 세포는, 아마 1개월의 시간 내에 약 30,000,000개의 세포에 도달하면서, 매우 신속하게 증식될 수 있다. 본 발명자들의 연구는 추가로, 이들 세포가, 평활근 마커가 계대 3만큼 조기에 존재함에 따라, 사실상 진정 줄기 세포 집단보다는 평활근 세포 집단을 나타낼 수 있음을 입증하였다. RTPCR에 의해 입증된 바와 같이, SMC 마커 mRNA의 발현이 P0 만큼 조기에 나타날 수 있었다. 또한, 표준 콜라겐 겔 수축 검정에 의해 입증된 바와 같이, 단리된 평활근 세포는 수축 기능을 할 수 있다.

[0322] 평활근 세포의 특성화. 본 발명자들은 후속 계대 동안, 평활근 세포의 세포 형태가 유지된다는 것을 이미 보여주었다. 또한, 유전자 및 단백질 수준 둘다에서 평활근 마커의 우수한 상관관계가 존재하였다.

[0323] 시토카인 유도. 지방 평활근 세포에 의한 MCP-1의 발현은 MCP-1의 생성이, 직접적으로 또는 간접적으로 천연 중간엽 줄기 세포가 구조물 내에서 보충/이동되거나 증식하도록 함으로써, 네오-기관 또는 조직 구조 재생에 있어 핵심적 역할을 할 수 있다는 가정으로 유도한다.

[0324] 실시예 2 - MCP-1 생성 및 세포 밀도

[0325] 방광 평활근 세포의 배양으로부터 컨디셔닝된 배지를 MCP-1의 검출 및 정량화를 위해 시판되는 키트를 이용하여 분석하였다. 9개의 구조물 (3개의 시딩 수준으로부터 3개씩)로부터 컨디셔닝된 배지 샘플 및 구조물 시딩에 사용된 쌍을 이루는 SMC 세포를 MCP-1 수준에 대하여 시험하였다. 결과를 표 2.1에 나타내었다.

[0326] [표 2.1]

| 시험 ID | 샘플 ID | cIL2 pg/ml | cIL6 pg/ml | cIL10 pg/ml | cMCP-1 pg/ml | cIFNg pg/ml | cTNFa pg/ml | cTGFb pg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TT1 | <1.0 | <9.8 | 1.0 | <3.7 | <2.4 | <0.2 | |
| 2 | TT2 | <1.0 | 8.8 | <2.0 | 39.6 | <2.4 | <0.2 | |

[0327]

[0328] 구조물 배지 내에 존재하는 MCP-1을 정량화하기 위해, R&D 시스템로부터의 개 MCP-1에 특이적인 ELISA 기반 검정 시스템을 사용하였다. 샘플을 이중 검정하고, 표준 곡선과 비교하여 구조물 배지 내의 MCP-1 수준의 추정치를 얻었다. 도 25에 나타낸 바와 같이, 이 분석으로부터의 결과는 시딩된 세포의 밀도 및 MCP-1 생성 사이에 양의 상관관계가 있음을 보여준다. 표 2.2는 R&D 시스템 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 구조물 배지의 MCP-1 정량화를 보여준다.

[0329] [표 2.2]

| 군 | 구조물 | MCP-1 pg/ml | 군 평균 | 표준 편차 |
|---|---|---|---|---|
| 4백만 | 1151 | 71 | 65 | 24 |
| | 1152 | 102 | | |
| | 1153 | 59 | | |
| | 1154 | 80 | | |
| | 1155 | 74 | | |
| | 1156 | 24 | | |
| | 1157 | 70 | | |
| | 1158 | 39 | | |
| 12백만 | 1159 | 253 | 188 | 135 |
| | 1160 | 85 | | |
| | 1161 | 412 | | |
| | 1162 | 167 | | |
| | 1163 | 69 | | |
| | 1164 | 349 | | |
| | 1165 | 91 | | |
| | 1166 | 78 | | |
| 25백만 | 1167 | 183 | 385 | 207 |
| | 1168 | 307 | | |
| | 1169 | 181 | | |
| | 1170 | 527 | | |
| | 1171 | 771 | | |
| | 1172 | 534 | | |
| | 1173 | 260 | | |
| | 1174 | 321 | | |

[0330]

[0331] 표 2.3은 각각의 군으로부터의 평균 MCP-1 수준의 비교를 도시하며, 이에 의해 결과적인 비율이 시딩 밀도에서의 차이에 필적하는 것을 확인할 수 있었다.

[0332] [표 2.3]

| 군 | 평균 MCP-1 | 4백만 MCP-1 | 4백만 세포 수 | 12백만 MCP-1 | 12백만 세포 수 | 25백만 MCP-1 | 25백만 세포 수 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4백만 | 65 | | | 0.35 | 0.33 | 0.17 | 0.16 |
| 12백만 | 188 | 2.89 | 3.00 | | | 0.49 | 0.48 |
| 25백만 | 385 | 5.92 | 6.25 | 2.05 | 2.08 | | |

[0333]

[0334] 결과는, 배지에서 검출된 세포 수와 MCP-1 수준 사이에 양의 상관 관계가 있음을 나타내었다. 이전에는, SMC 외식을 위해 프로세싱된 재생된 개 방광 (대략 9백만 세포 시딩)으로부터의 일부 조직이 본래의 재생된 개 조직에서 전형적으로 관찰되는 것에 비해 더 많은 지방을 함유하였음이 주목되었다. 외식시 조직은 매우 연질이었고, 보았을 때 외식물은 본래의 조직에서 관찰된 것보다 더 많은 비율로 지방 조직을 함유하였다. 이들 외식물 플레이트 상의 배지는 또한 지방 조직이 존재할 때 전형적으로 관찰되는 표면 상의 "광택"을 나타내었다. 이러한 관찰은 재생된 방광 조직의 지방 침착/지방 세포 발생에서 MCP-1/CCR-2 상호작용에 대한 역할을 시사한다.

[0335] 실시예 3 - 돼지에서 네오-요로관 구조물의 이식

[0336] 이 연구의 목적은 네오-요로관의 수술적 이식 및 수술후 관리의 평가를 조사할 뿐만 아니라, 네오-요로관 (NUC) 시험품의 이식후 비뇨기-유사 조직 재생 및 임플란트로 네오-요로관 공급 및 수밀을 제공하는 돼지 복막의 능력을 평가하는 것이었다.

[0337] 네오-요로관 (NUC) 구조물 시험품은 자가 평활근 세포 (SMC)의 존재 또는 부재하에 부직 폴리글리콜산 (PGA) 펠트 및 폴리(락트산-코-글리콜산) 중합체 (PLGA)로부터 형성된 지지체로 구성되었다. 동물로부터 미리 제거된

세포를 사용하여, 동일한 동물에 이식된 구조물을 생성하였다. 구조물은 자가 SMC와 조합되어 부직 폴리글리콜산 (PGA) 펠트 및 폴리(락트산-코-글리콜산) 중합체 (PLGA)로부터 형성된 지지체로 구성된 멸균 관형 생체재료를 지칭한다. 용어 지지체-단독은 세포없이 부직 폴리글리콜산 (PGA) 펠트 및 폴리(락트산-코-글리콜산) 중합체 (PLGA)로부터 형성된 지지체로 구성된 멸균 관형 생체재료를 지칭한다.

[0338] 이 연구에서, 사용된 구조물은 지지체 및 SMC로 구성된 시험품에 상응하고, 지지체 단독은 SMC 없이 지지체로 구성된 시험품을 나타낸다. 7마리의 암컷 괴팅겐(Gottingen) 미니돼지를 시험품으로의 이식을 위해 3개 군: 군 1에서 N=1 (지지체-단독), 군 2에서 N=3 (혈액 유래의 SMC로 시딩된 지지체), 및 군 3에서 N=3 (지방 유래의 SMC로 시딩된 지지체)으로 나누었다.

[0339] 돼지는 돼지와 인간 사이의 복부 및 상부 요로 해부학, 수술 조작 전략, 스토마 배치 및 치유, 수술후 치유 및 복막 해부학에서의 유사성에 비추어 볼 때 네오-요로관의 평가를 위한 적합한 동물 모델인 것으로 고려되었다. 돼지는 또한 인간에서의 정상적인 치유 과정과 거의 근사한, 피부 상처 치유의 널리 정립된 동물 모델이며, 이는 스토마 치유의 평가를 허용한다. 괴팅겐 미니돼지는 3개월 연구 기간 동안 그의 느린 평균 성장 속도를 기초로 품종으로서 선택되었다. 자가 SMC는 시험품 이식 대략 10-11 주 전에 모든 동물로부터의 지방 조직 생검 및 정맥 혈액 샘플로부터 수득하였다. 구체적인 시험품은 각각의 군에서 제0일에 수술로 이식되었다. 방광의 수술적 제거 (전체 방광절제술) 이후, 요관은 시험품의 유입 (앞쪽) 말단으로의 문합을 위해 스텐트 삽입되고 동원화되었다. 벽측복막은 중심선의 백선에서 시작하여 복벽의 우측 및 좌측을 향해 양측으로 복벽으로부터 분리되었다. 복막을 좌측에서 절개하고, 이를 이용하여 중심선 부분의 우측을 향해 임플란트를 랩핑하였고, 이는 혈관 공급원 및 수밀 소변 채널을 제공하였고, 임플란트의 뒤쪽 말단 (복강내에 위치함)과 피부 사이에 관상 연결 (아트리움)을 형성하였다. 임플란트의 뒤쪽 말단은 피부 스토마로부터 대략 5 내지 7 cm 떨어진 복막 아트리움 내에서 종결되었다. 아트리움을 앞쪽 복막 랩핑을 이용하여 연장시켰고, 이는 복벽을 횡단하여 검상연골 근처의 피부 (중심선에서 떨어져 있음, 우측)로 나왔다. 외면화된 복막을 피부에 봉합시켜 복막-피부 접합부 및 복막-내층 스토마 관강을 형성하였다.

[0340] 요관 스텐트에 연결된 봉합사 가닥은 추후 제거를 위해 스토마를 통해 몸 밖으로 내었다. 복부 절개는 비-흡수성 프롤렌 (Prolene) 봉합선으로 밀폐시켰다. 피부는 통상적인 방식으로 밀폐시켰다. 폴리 카테터를 스토마에 삽입하여, 스토마 치유 동안에 소변 통로를 허용하였다. 모든 동물에 대해 동일한 수술적 절차를 이용하였다. 폴리 카테터를 제거한 후, 모든 동물은 소변 배출을 용이하게 하기 위해 트라코에(TRACOE(등록상표)) 스토마 포트를 설치하였다. 동물이 스토마 포트를 제거할 수 있어서, 8Fr 폴리 카테터를 이용하여 배뇨를 보조하였다. 아트리움 및 스토마에서의 배설물 축적은 스토마를 관리하기 위해 직경이 더 큰 변형된 연장 세트 (연구 특이적)의 사용을 유도하였다.

[0341] 스토마 보수 및 재배치는 매주 계획되었고, 필요한 기준에 따라 수행되었다. 혈액학 및 혈청 화학을 위해 혈액 샘플을 수집하고, 분석하여, 결과를 기저시점에서, 이식후 제1주 내지 제4주 동안 매주, 제8주 및 부검시에 기록하였다. 소변검사를 위해 소변 샘플을 수집하고, 분석하여, 결과를 기저시점에서 및 부검시에 기록하였다. 구조물, 요관 및 신장의 영상화 (형광투시, 초음파검사 및/또는 내시경검사)를 연구하는 동안 제2주, 제4주, 제8주 및 부검시에 수행하였다. 또한, 부정적인 임상적 징후 (예를 들어, 요류 결여의 관찰 또는 누관 형성의 의심)에 대한 반응으로서 필요에 따라 영상화를 수행하였다. 누관은 농양, 공동 또는 중공 기관을 체표면 또는 다른 중공 기관 (예를 들어, 장과 장 사이 또는 장과 도관 사이)에 연결하는 비정상적인 덕트 또는 통로를 지칭한다.

[0342] 부검시에, 복강을 개방하여, 도관을 스토마, 신장 및 요관과 함께 일괄적으로 제거하기 전에, 도관을 가시화하고 사진 촬영하였다. 신장에서부터 피부 스토마까지의 전체 요로, 국부 림프절, 및 전체적으로 관찰된 임의의 다른 병변의 대표적인 조직 샘플을 수득하였다. 모든 조직 샘플을 조직학적 프로세싱 및 평가를 위해 10% 중성 완충된 포르말린 (NBF)에 넣었다. 고정후, 조직을 마이크로슬라이드로 통상적으로 프로세싱하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 및 마손 3색으로 염색하였다. 슬라이드를 현미경적으로 평가하였다.

[0343] 결과: 이식 (수술적 방법): 모든 동물은 특별한 일 없이 이식 수술에서 회복되었고, 스토마는 소변을 배출하고 있는 것으로 보였다. 동물 모델은 NUC (네오-요로관)의 이식을 위한 수술적 절차를 평가하는데 적절한 것으로 고려되었다.

[0344] *이환율 및 사망률*: 동물은 제28일 내지 제83일에 생존하였다. 7마리의 동물 중 하나는 계획적인 희생시까지 생존하였다 (군 2의 동물 4, 83일). 7마리의 동물 중 6마리는 계획되지 않고 희생되었고, 군 3의 동물 5는 조직병리학적 분석을 위해 이식후 제28일에 선택적으로 안락사시켰고, 5마리의 동물은 이식후 제38일 내지 제63일

사이에 불량한 임상적 상태로 인해 안락사시켰다. (군 1의 동물 1, 군 2의 동물 2 및 3, 및 군 3의 동물 6 및 7). 이러한 계획되지 않은 사망은 모든 치료군에서 발생하였고, 상부 요로의 손상으로 인한 바이러스 감염 및/또는 폐쇄-관련 병리학에 기인하였다.

[0345] *수술후 치유*: 이식후 제1일 내지 제30일: 모든 동물은 치료와 무관하게 수술후 스토마 보수 (예를 들어, 매주 제거시 및 필요한 기준에 따라 잔해의 플러싱 및 클리닝, 및 카테터 및 스토마 포트의 재배치)를 필요로 하였다. 치유 및 재생 과정 동안에 잔해가 형성되었다. 박리된 조직 세포, 염증성 분비물 및 지지체 생분해물은 잔해의 공급원이다. 적절한 배출이 없으면 (예를 들어, 폐쇄로 인해), 고인 잔해가 배설물 (도관의 관강 내에 반고체 볼루스)을 형성한다.

[0346] 이식후 제31일에서 부검시까지: 모든 동물은 소변 배출의 부분적인 또는 완전한 폐쇄를 입증하였다. 요류의 폐쇄는 잔해 축적과 함께 또는 없이 관찰되었다. 수술로 이식된 시험품의 복부 배치는 사지 동물 모델에서 요류의 물리적 폐쇄에 기여하였고, 여기서 위에 놓인 복부 기관의 중량은 도관 폐쇄, 유착 및 누관 형성, 및 2차 상부 요로 신장 합병증 (예를 들어, 요관 또는 신장의 확장, 염증 및/또는 감염)에 기여하였다. 유착은 2개의 조직 표면의 결합을 지칭한다. 복부내 및/또는 골반 유착은 공통적인 수술후 합병증이다. 부검시에, 도관 또는 요관에 대한 유착이 크게 그리고 방사선사진에 의해 관찰되었고, 현미경적 상관관계에 대한 노력이 시도되었다.

[0347] 게다가, 요류 폐쇄는 아트리움을 형성하기 위한 복막의 사용에 의해 악화되어, 후속적인 배설물 축적 및 박테리아 감염으로 인한 부분적인 또는 완전한 요로 폐쇄를 초래하였다. 아트리움은 복벽을 통해 소변 통과를 허용하는 전방 연결 챔버를 지칭한다. 이 절편은 시험품의 뒤쪽 말단 (피부로부터 대략 5 내지 7 ㎝에 떨어져 위치함)을 피부에 연결하는 복막 랩핑의 가장 전방의 관형-유사 부분에 의해 만들어졌다.

[0348] 시험품의 수술적 배치는 모든 연구 동물에서 동일하였고, 따라서 폐쇄-관련 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘을 가졌다 (즉, 복부 내용물 압력 및 복막 아트리움은 배설물 축적에 기여함).

[0349] 재생: 비뇨기-유사 조직의 재생은 불과 제28일에 명백하였고, 선택적으로 안락사시킨 군 3의 동물 5 (지방 유래의 SMC)에서 요관-도관 접합부 (UCJ)에서 요로상피, 고유판 및 평활근 다발이 존재하였다. 임플란트의 요관 말단에서의 재생 과정은 구조물 임플란트를 수용하는 동물 (군 2 및 3) 중에서 비교가능하였던 비뇨기-유사 조직 형성을 초래하였다. 구조물 군 (군 2 및 3)에서 비뇨기-유사 조직 재생의 정도는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다. 계획적인 희생시까지 생존한 1마리 동물 (군 2의 동물 4, 제83일)은 바이러스 감염이 검출되었음에도 불구하고 도관의 UCJ, 앞쪽 및 중간 부분에 존재하는 요로상피 및 평활근을 가졌다. 그러나, 복막 단독 아트리움은 비뇨기-유사 조직 재생을 뒷받침하기에는 불충분하였고, 아트리움에서 형성된 조직은 요로상피 점막 내층없이 섬유성 결합 조직으로 이루어진 벽을 가졌다. 도관에서부터 아트리움까지의 전이 지점은 임플란트의 뒤쪽 말단이 복막 랩핑 내에서 자유롭게 부유하기 때문에 동물마다 달랐는데, 이는 도관에서 아트리움으로의 전이를 부검시에 규정하기 어렵게 만들었다. (추정적인) 뒤쪽 도관의 전형적인 조성은 섬유모세포 및/또는 근섬유모세포와 회합된 조직화된 콜라겐이었다. 복막 아트리움은 비뇨기-유사 조직 재생에는 불충분한 것으로 보이지만, 복막은 NUC 임플란트로의 혈관증식의 공급원으로서 기능한다.

[0350] **결론**: 돼지 동물 모델은 수술 및 요로 전환술로부터 회복한 모든 동물이 달성되었기 때문에 이 파일럿 연구에서 네오-요로관의 수술적 적용을 평가하는데 적절한 것으로 판명되었다. 게다가, 돼지 모델은 요류 폐쇄의 수술후 치유 및 상부 요로에 대한 그의 영향을 평가하는데 적절하였다. 마지막으로, 돼지 모델은 시험품이 배설물 축적 및 박테리아 콜로니화, 바이러스 감염, 및 장 유착 및 누관에 의해 복잡해진 환경에서 비뇨기-유사 조직을 재생하는 능력을 평가하는데 적절하였다. 사지 동물의 복부 바닥에서 요로 전환체의 해부학적 배치에 의해 소변 배출이 부분적으로 폐쇄되었지만, 수술적 방법은 성공적인 것으로 결정되었다. 상기 동물 모델은 네오-요로관의 수술적 적용, 수술후 치유 및 기능성을 평가하는데 적절한 것으로 고려되었다.

[0351] 이식후 처음 30일 동안의 수술후 결과는, 돼지에서 요로 전환술 후에 드문 것으로 고려되지 않았던 결과인 것으로 밝혀졌다.

[0352] 몇몇 혼동 인자가 연구하는 동안에 발생하였지만 (즉, 복부 바닥에서의 수술적 배치, 복막 아트리움의 사용, 및 바이러스 감염), 비뇨기-유사 조직의 재생은 불과 제28일에 명백하였고, 선택적으로 안락사시킨 동물 (군 3의 동물 5, 지방 유래의 SMC)에서 요관-도관 접합부 (UCJ)에서 요로상피, 고유판 및 평활근 다발이 존재하였다.

[0353] 구조물 군 (군 2 및 3)에서 비뇨기-유사 조직 재생의 정도는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다. 계획적인 희생시까지 생존한 1마리 동물 (군 2의 동물 4, 제83일)은 바이러스 감염이 검출되었음에도 불구하고 상기 도관의 UCJ, 앞쪽 및 중간 부분에 존재하는 요로상피 및 평활근을 가졌다.

[0354] 지지체를 혈액 또는 지방으로부터 유래된 SMC로 시딩하였을 때 (각각 군 2 및 3) 재생 과정에서 명백한 차이가 관찰되지 않았는데, 이는 SMC 공급원들 사이에서 재생 촉진이 동등함을 시사한다.

[0355] 도관의 아트리움 절편에서 복막으로부터 형성된 조직은 요로상피 내층 없이 섬유성 결합 조직으로 이루어진 벽을 가졌다.

[0356] **실험 설계**

[0357] 개관: 7마리의 암컷 괴팅겐 미니돼지를 3개의 군: 군 1에서 N=1 (지지체 단독), 군 2에서 N=3 (혈액 유래의 SMC), 및 군 3에서 N=3 (지방 유래의 SMC)으로 나누고, 시험품을 이식하였다. 자가 SMC는 시험품 이식 대략 10-11 주 전에 모든 동물로부터의 지방 조직 생검 및 정맥 혈액 샘플로부터 수득하였다. 구체적인 시험품은 각각의 군에서 제0일에 수술로 이식되었다. 방광의 수술적 제거 (전체 방광절제술) 이후, 요관은 시험품의 유입 (앞쪽) 말단으로의 문합을 위해 스텐트 삽입되고 동원화되었다. 벽측 복막은 중심선의 백선에서 시작하여 복벽의 우측 및 좌측을 향해 양측으로 복벽으로부터 분리되었다. 복막을 좌측에서 절개하고, 이를 이용하여 중심선의 우측을 향해 임플란트를 랩핑하였고, 이는 혈관 공급원 및 수밀 소변 채널을 제공하였고, 임플란트의 뒤쪽 말단 (복강내에 위치함)과 피부 사이에 관상 연결 (아트리움)을 형성하였다. 임플란트의 뒤쪽 말단은 피부 스토마로부터 대략 5 내지 7 cm 떨어진 복막 아트리움 내에서 종결되었다. 아트리움을 앞쪽 복막 랩핑을 이용하여 연장시켰고, 이는 복벽을 횡단하여 검상연골 근처의 피부 (중심선에서 떨어져 있음, 우측)로 나왔다. 외면화된 복막을 피부에 봉합시켜 복막-피부 접합부 및 복막-내층 스토마 관강을 형성하였다. 요관 스텐트에 연결된 봉합사 가닥은 추후 제거를 위해 스토마를 통해 몸 밖으로 내었다. 복부 절개는 비-흡수성 프롤렌 봉합선으로 밀폐시켰다. 피부는 통상적인 방식으로 밀폐시켰다. 폴리 카테터를 스토마에 삽입하여, 스토마 치유 동안에 소변 통로를 허용하였다. 모든 동물에 대해 동일한 수술적 절차를 이용하였다.

[0358] 폴리 카테터를 제거한 후, 모든 동물은 소변 배출을 용이하게 하기 위해 트라코에(등록상표) 스토마 포트를 설치하였다. 동물이 스토마 포트를 제거할 수 있어서, 8Fr 폴리 카테터를 이용하여 배뇨를 보조하였다. 아트리움 및 스토마에서의 배설물 축적은 스토마를 관리하기 위해 직경이 더 큰 변형된 연장 세트 (연구 특이적)의 사용을 유도하였다. 스토마 보수 및 포트/카테터 재배치는 매주 계획되었고, 필요한 기준에 따라 수행되었다.

[0359] 혈액학 및 혈청 화학을 위해 혈액 샘플을 수집하고, 분석하여, 결과를 기저시점에서, 이식후 제1주 내지 제4주 동안 매주, 제8주 및 부검시에 기록하였다. 소변검사를 위해 소변 샘플을 수집하고, 분석하여, 결과를 기저시점에서 및 부검시에 기록하였다. 구조물, 요관 및 신장의 영상화 (형광투시, 초음파검사 및/또는 내시경검사)를 연구하는 동안 제2주, 제4주, 제8주 및 부검시에 수행하였다. 또한, 부정적인 임상적 징후 (예를 들어, 요류 결여의 관찰 또는 누관 형성의 의심)에 대한 반응으로서 필요에 따라 영상화를 수행하였다. 부검시에, 복강을 개방하여, 도관을 스토마, 신장 및 요관과 함께 일괄적으로 제거하기 전에, 도관을 가시화하고 사진 촬영하였다. 신장에서부터 피부 스토마까지의 전체 요로, 국부 림프절, 및 전체적으로 관찰된 임의의 다른 병변의 대표적인 조직 샘플을 수득하였다. 모든 조직 샘플을 조직학적 프로세싱 및 평가를 위해 베트 패쓰 서비시즈, 인크.(Vet Path Services, Inc.)로 발송하기 24 내지 48시간 전에 10% 중성 완충된 포르말린 (NBF)에 넣었다. 고정후, 조직을 마이크로슬라이드로 통상적으로 프로세싱하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 및 마손 3색으로 염색하였다. 슬라이드를 현미경적으로 평가하였다. 병리학적 기록은 하기 실시예에서 나타난다.

[0360] 하기 표 3.1은 연구 디자인의 개요를 제공한다.

[0361] [표 3.1]

| 군 번호 | 처리 | 동물의 번호 | 생검 절차 (대략 제70일) | 수술 절차 (제0일) | 수술후 절차 | 추정된 부검 시점 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 지지체 단독 | 1 | 지방 생검의 제거, 혈액 수집 | 방광절제술 이후, 유입 말단으로의 요관의 전위에 의해 네오-요로관 이식. 불연속 스토마를 생성하기 위해, 시험품의 말단으로부터 피부를 통한 복막 전위를 이용하여, 전체 시험품을 복막으로 랩핑함. | 형광투시 및 초음파실험, 전반적인 건강 평가 및 임상적 치료, 필요에 따라 임상 병리학 및 소변검사 | 84±5일 |
| 2 | 자가 혈액 SMC | 3 | | | | |
| 3 | 자가 지방 SMC | 3 | | | | |

[0362]

[0363] 돼지는 돼지와 인간 사이의 복부 및 상부 요로 해부학, 수술 조작 전략, 스토마 배치 및 치유, 및 수술후 치유의 유사성에 비추어 볼 때 네오-요로관의 평가를 위한 최적의 동물 모델인 것으로 고려되었다. 돼지는 인간에서의 정상적인 치유 과정과 거의 근사한, 피부 상처 치유의 널리 정립된 동물 모델이며, 이는 스토마 치유의 평가를 허용한다. 장막은 이전에 개에서 비뇨기 조직 재생을 위해 혈액 공급 및 수밀 표면을 제공하는데 유효하였다. 현행 연구에서, 복막이 NUC를 위해 혈관 공급 및 수밀을 제공하는 능력은 평가중에 있으며, 돼지는 인간과 유사한 벽측복막을 가진 유일한 큰 동물 종이다. 괴팅겐 미니돼지는 3개월 연구 기간 동안 느린 평균 성장 속도를 기초로 품종으로서 선택되었다.

[0364] **물질 및 방법**

[0365] 시험 장치 - 시험품은 i) 자가 지방 유래의 돼지 평활근 세포 ($2.5\times10^7$개 세포 또는 $2.5\times10^7$개 세포)로 시딩된 합성 락티드/글리콜리드 중합체를 포함하는 도관형 지지체; ii) 자가 혈액 유래의 돼지 평활근 세포 ($2.5\times10^7$개 세포 또는 $2.5\times10^7$개 세포)로 시딩된 합성 락티드/글리콜리드 중합체를 포함하는 도관형 지지체 및 iii) 어떠한 세포로도 시딩되지 않은 합성 락티드/글리콜리드 중합체를 포함하는 도관형 지지체이었다.

[0366] 동물. 총 7마리의 동물을 시험품으로 이식하였다. 시험품으로 이식된 7마리의 동물 (군 3) 중 하나는 1개월 시점 (제28일)에 조직병리학적 평가를 위해 선택적으로 안락사시켜졌다. 다른 모든 동물은 연구 과정 동안 안락사시켜졌다.

[0367] 수술 절차.

[0368] 생검/조직 수집. 모든 동물 (군 1- 3)에 대해, 지방 조직의 생검 뿐만 아니라 정맥 혈액을 제0일로부터 10-11주 전에 채취하였다 (이식 절차). 조직 생검 절차를 위해, 중간선 절개를 배꼽의 바로 아래에서 시작하여 복부에서 수행하였다. 21-34 g의 연성 지방 생검, 유연한 피하 지방 조직 (결합 조직 없음)을 상기 중간선 접근점으로부터 무균적으로 수집하였다. 수집한 조직 샘플을 개별적으로 그리고 무균적으로 조직 배양 배지를 함유한 용기로 옮겼다. 적절한 크기의 흡수성 봉합사 물질을 사용하여 복부 절개를 층별로 봉합하였다. 다시 적절한 크기의 흡수성 봉합사 물질을 사용하여 피부를 표피하 방식으로 봉합하였다. 대략 6개의 10 ml 분취량의 정맥 혈액을 헤파린 처리된 진공채혈관에 수집하였다.

[0369] 관삽입술 절차. 시험품 이식 12-18일 전에, 혈액 수집을 용이하게 하기 위해 유치 카테터를 각각의 동물의 경정맥에 배치하였다. 우측 경정맥을 둘러싸고 있는 영역을 면도하고, 상기 기재된 바와 같이 준비하였다. 모든 동물에게 멸균 5.5-mm ID 규소 카테터 (우측 외경정맥에 삽입하고 움직이지 않도록 봉합사로 고정함)로 캐뉼러를 삽입하였다. 특대의 다빈치(DaVINCI) 포트를 부착하고, 피하 주머니에 이식하였다.

[0370] 시험 장치 이식. 배꼽의 5 cm 앞쪽으로부터 뒤쪽으로 대략 15 cm 확장하여 중간선 복부 절개를 수행하였다. 복막을 확인한 후, 복벽으로부터 조심스럽게 분리하였다 (중간선의 백색선으로부터 출발하여 복벽의 우측 및 좌측을 향해 양측으로). 조직이 무손상의 혈관분포 상태로 유지되도록 치유하였다. 이어서, 방광을 노출시키고, 복강으로 들어가는 소변이 없도록 보호하면서 조심스럽게 소변을 빼냈다. 방광으로 공급되는 동맥 및 정맥을 확인하고, 결찰시켰다. 수뇨관을 확인하고, 스텐트를 설치하고 (2개의 14-cm 7Fr 다빈치 비-흡수성 수뇨관 스

텐트, 상행 방식으로 삽입), 방광으로부터 조심스럽게 횡절단하였다. 요도를 횡절단하였으므로 이를 감침질하였다(over-sewn). 이어서, 방광을 제거하였다. 좌측 수뇨관을 시험품의 우측에 도달하기에 충분한 이동성이 생길 때까지 앞쪽으로 확장하여 둘러싸고 있는 복막후 근막으로부터 조심스럽게 분리해냈다. 우측 수뇨관을 시험품의 반대 측면에 자유롭게 도달하도록 박리하였다. 3-0 바이크릴(Vicryl)을 사용하여 수뇨관을 시험품 상에 단순 연속 패턴으로 봉합하였다. 복막을 좌측에서 횡절단하고 중간선 부위의 우측을 향해 임플란트를 랩핑하는 데 사용하였고, 이는 혈관 공급원 및 방수 소변 채널을 제공하고, 임플란트 (복강내에 위치)의 뒤쪽 말단과 피부 사이에 세뇨관 연결 (아트리움)을 형성하였다. 임플란트의 뒤쪽 말단은 피부 스토마로부터 대략 5 내지 7 cm 떨어진 복막 아트리움에서 종착되었다. 복막을 3-0 바이크릴로 봉합하였다. 앞쪽 복막 랩을 사용하여 아트리움을 확장시켰다 (복벽을 가로질러 검상돌기 부근의 피부 (중간선에서 떨어진 우측)에서 종료). 외부화된 복막을 봉합하여 복막-피부 연결부 및 복막-경계의 스토마 내강을 형성하였다. 이어서, 수술용 접착제를, 복막이 체벽에서 종료된 봉합사 경계를 따라 도포하였다. 수뇨관 스텐트에 연결된 봉합사 가닥을, 이후에 제거하기 위해 스토마를 통해 외부화시켰다. 비-흡수성 프롤렌 봉합사를 사용하여 복부 절개를 봉합하였다. 통상적 방식으로 피부를 봉합하였다. 폴리(Foley) 카테터를 스토마 내로 삽입하여 스토마 치유 중에 소변이 통과되도록 하였다. 모든 동물에 대해 동일한 수술 절차를 이용하였다.

[0371] 스토마 보수. 이식 후 2주 동안 또는 절개 부위가 치유될 때까지, 수술 부위를 열개, 이상 분비물, 냄새, 자극 또는 임의의 이상의 모든 징후에 대해 평가하였다. 스토마 구역 및 둘러싸고 있는 조직을 1일 2회 세척하고, 소변 배출에 대해 스토마 카테터를 관찰하였다. 적하물이 없을 때, 카테터를 멸균 염수로 플러싱하여 소통성을 확인하였다. 스토마가 막힌 경우, 염수 플러싱 후 겸자로 응집물 및 막힘 물질을 제거하였다. 이러한 노력에도 복원되지 않으면, 소변을 자유 유출시키고, 새로운 카테터를 설치하고 프롤렌 봉합사를 사용하여 제자리에 고정하였다. 또한, 스토마 포트를 설치하고, 2-0 프롤렌 봉합사를 사용하여 고정하였다.

[0372] 스텐트 제거. 이식 수술 2-4 주 후로부터 다양한 시점에, 동물을 상기 기재된 바와 같이 마취하고, 수뇨관 스텐트를 제거하였다.

[0373] 경정맥 포트. 경정맥 포트 카테터를 주사가능한 염수로 플러싱하고, 4주째까지 매주, 그리고 후속 사용시마다 소통을 확고히 하기 위해 헤파린 (100 U/mL, 약 2-3 mL)을 통과시켰다.

[0374] 영상화.

[0375] 초음파검사. 도관 및 신장의 초음파 영상화를 2주째, 4주째, 8주째 및 부검 전에 수행하였다.

[0376] 방광경검사. 4주째에 방광 스코프 (망원경 또는 현미경과 같은 렌즈를 갖는 가요성 광학 섬유)를 삽입하여 방광경검사를 수행함으로써 도관 내부 표면을 관찰하고 상기 논의된 바와 같이 수뇨관 스텐트를 제거하였다. 상기 절차를 위해 동물을 마취하였다.

[0377] 체중. 체중을 기저시점, 매주 그리고 부검 전에 기록하였다.

[0378] 임상 병리.

[0379] 혈액 수집. 혈액학 (CBC), 응고, 및 혈청 화학 파라미터 분석을 위한 혈액 샘플을 경정맥내 유치 포트를 통해 계획된 시점 (기저시점, 1주째, 2주째, 3주째, 4주째 및 8주째, 및 부검 전)에 수집하였다.

[0380] 혈액학. 혈액학 샘플을 2.0 ml EDTA 튜브에 수집하고, 아이덱스(Idexx)로 이동 (습윤 얼음 (2-8℃) 상에서)시키기 전에 냉장 보관하거나, 또는 습윤 얼음 상에 보관하였다. 프로토콜에 명시된 바와 같이, 분석을 용이하게 하기 위해 이동은 수집 24시간 이내의 시기로 맞추었다. 샘플을 하기 혈액학 파라미터에 대해 평가하였다: 전체 백혈구 계수 (WBC); 적혈구 계수 (RBC); 헤모글로빈 농도 (HGB); 적혈구용적률 값 (HCT) 1; 평균 적혈구 용적 (MCV); 평균 적혈구 헤모글로빈 (MCH) 1; 평균 적혈구 헤모글로빈 농도 (MCHC) 1; 혈소판 계수 (PLT); 관련 망상적혈구 계수 (RTC) [여기서 1 = 계산된 값].

[0381] 응고. 응고 샘플을 1.8-ml 시트르산나트륨 튜브 (3.8% 시트르산나트륨 0.2 mL)에 수집하고, 원심분리 (8,000 RPM에서 10-15분 동안)할 때까지 습윤 얼음 상에 보관하였다. 혈장을 제거하고, 2개의 표지된 바이알 사이에 분배한 후, -70℃에서 동결시켰다. 1개의 바이알을 드라이아이스 상에 포장하여 분석을 위해 아이덱스로 보내고, 나머지 바이알을 연구의 종결시까지 보존물로서 보관하였다. 샘플을 하기 파라미터에 대해 평가하였다: 프로트롬빈 시간 (PT); 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (APTT); 피브리노겐 (FIB).

[0382] 혈청 화학. 혈청 화학 분석을 위해 혈액 샘플을 대략 4.0-ml 혈청 분리 튜브에 수집하였다. 혈액 샘플을 10,000 RPM에서 10-15분 동안 원심분리하고, 멸균 기술을 이용하여 혈청을 추출하였다. 혈청을 2개의 표지된

바이알 사이에 분배하고, -70℃에서 동결시켰다. 1개의 바이알을 드라이아이스 상에 포장하여 분석을 위해 아이덱스로 보내고, 나머지 바이알을 연구의 종결시까지 보존물로서 보관하였다. 샘플을 하기 혈청 화학 파라미터에 대해 평가하였다: 글루코스 (GLU); 우레아 질소 (BUN); 크레아티닌 (CRE); 전체 단백질 (TPR); 알부민 (ALB); 글로불린 (GLOB) 1; 알부민/글로불린 비율 (A/G) 1; 칼슘 (CAL); 인 (PHOS); 나트륨 (NA); 칼륨 (K); 클로라이드 (CL); 전체 콜레스테롤 (CHOL); 전체 빌리루빈 (TBIL); 트리글리세리드 (TRG); 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT); 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST); 알칼리성 포스파타제 (ALK); 감마 글루타밀트랜스퍼라제 (GGT) [여기서 1 = 계산된 값].

[0383] 혈액 가스. 동맥 혈액 가스 샘플을 주사기 (약 1.0 mL)에 수집하고, 혈액을 내부에서 분석하기 위해 CG8+ i-STAT 카트리지에 넣었다. 샘플을 하기 혈액 가스 파라미터에 대해 평가하였다: 나트륨 (Na) (mmol/L) PCO2 (mm Hg); 칼륨 (K) (mmol/L) PO2 (mm Hg); 이온화 칼슘 (iCa) (mmol/L) TCO2 (mmol/L); 글루코스 (Glu) (mg/dL) HCO3 (mmol/L); 적혈구용적률 (Hct) (%) BEecf (mmol/L); pH; 및 SO2 (%).

[0384] 소변 수집. 소변 샘플을 기저시점 및 부검 전에 수집하였다. 대략 1.0 mL 및 3.0 mL 샘플을 정성 분석 및 정량 분석을 위해 각각 멸균 용기에 수집하였다. 멀티스틱스(Multistix)(등록상표) 10 SG 테스트 스트립 (Test Strip)을 이용하여 수집 시점에 정성 분석을 수행하였다. 포괄 정량 소변검사용 샘플을 냉장시키고, 수집 24시간 이내에 아이덱스 래보래토리즈 (IDEXX Laboratories; 매사추세츠주 노스 그래프턴)로 이동시켰다. 샘플을 하기 정성 소변검사 파라미터: 글루코스, 빌리루빈, 혈액, pH, 단백질, 케톤, 우로빌리노겐, 비중, 니트라이트 및 백혈구; 및 하기 정량 소변검사 파라미터: 박테리아 배양; 전체 박테리아; 글루코스; 및 전체 단백질에 대해 평가하였다.

[0385] 부검. 계획대로 (84±5 일째) 안락사시킨 동물에 대해, 신장, 도관, 수뇨관, 수뇨관-방광 접합부, 중간-도관, 도관-피부 접합부 및 림프절 (허리 및 상방 장간막)에 특히 집중하여 부검하였다.

[0386] 조직 수집. 안락사 및 부검시, 네오-도관 임플란트를 둘러싸고 있는 모든 조직을 총체적으로 검사하고 계내 사진촬영을 하였다. 신장, 부착된 수뇨관을 갖는 네오-도관 및 림프절을 수확하였다. 신장을 해부하여 사진촬영하였다. 부착된 수뇨관을 갖는 네오도관을 평가하고, 10% 표준 완충 염수 (NBF)를 사용하여 압력 관류하였다. 조직학적 프로세싱을 위해 수집한 모든 조직을 10% 표준 완충 염수 (NBF) 용액 중에 보관하였다.

[0387] 조직학 및 조직병리학. 비뇨 기관을 트리밍하고, 검사하고, 파라핀 중에 포매시키고, 절편화하였다. 샘플 절편화 계획과 관련된 구체적 세부사항은 병리학 보고 (하기)에 포함되어 있다. 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 및 마손 3색을 사용하여 슬라이드를 염색하였다.

[0388] 결과

[0389] 생검. 지방 조직 생검 (21-34 g) 및 정맥 혈액 (헤파린 처리된 튜브 내에 6×10 mL 분취량)을 프로토콜에 요약된 바와 같이 수집하였다. 지방 생검 샘플의 개별 중량을 부록 1에 표시하였다 (EE = 선출적 안락사; PCV-2 = 돼지 써코바이러스-2; SMC = 평활근 세포; S = 생존자; UD = 불량한 임상 조건으로 인한 계획되지 않은 사망; X = 관찰됨).

[0390] **이식 (수술 방법론).** 모든 동물이 사건없이 이식 수술로부터 회복되었고, 스토마는 육안으로 소변이 유출되는 것으로 보였다. 동물 모델은 수술 적용, 수술후 치유 및 네오-요로관의 기능성을 평가하기에 적절한 것으로 간주되었다.

[0391] 도 26은 연구용으로 사용된 수뇨관 스텐트를 나타낸다. 도 27은 네오-도관 구조물을 나타낸다. 도 28은 수뇨관에 부착된 네오-도관 구조물을 나타낸다. 도 29는 수뇨관에 부착된 네오-도관 구조물의 유입 말단 및 수술적으로 생성된 스토마 쪽으로 향해 있는 배출 말단을 나타낸다. 도 30은 소변 배출을 위한 스토마 및 카테터를 나타낸다.

[0392] 사망률. 계획된 희생 (군 2의 동물 4, 83일째)시까지 7마리 동물 중 1마리가 생존하였다. 7마리 동물 중 6마리가 계획밖으로 희생되었다: 군 3의 동물 5를 조직병리학적 분석을 위해 이식 28일 후에 선출적으로 안락사시켰고, 5마리의 동물 (군 1의 동물 1, 군 2의 동물 2 및 3, 및 군 3의 동물 6 및 7)을 불량한 임상 상태로 인해 이식 후 38 및 63일 사이에 안락사시켰다. 모든 처리군에서 이러한 계획되지 않은 사망이 발생하였고, 이는 상부 요로에 대한 손상으로 인한 바이러스 감염 및/또는 폐쇄-관련 병리가 원인이었다. 7마리의 동물 각각에 대한 최종 소인 및 밝혀진 사망률을 하기 표 3.2에 나타냈다 (EE = 선출적 안락사; PCV-2 = 돼지 써코바이러스-2; SMC = 평활근 세포; S = 생존자; UD = 불량한 임상 조건으로 인한 계획되지 않은 사망; X = 관찰됨).

[0393] 폐쇄. 도관 및 스토마를 통한 요류의 폐쇄가 4/6 계획되지 않은 사망 동물의 이환율에 대한 원인이었다. 여기에는 47일째에 안락사시킨 군 1의 동물 1; 38일째 및 40일째에 안락사시킨 군 2의 동물 2 및 3; 및 39일째에 안락사시킨 군 3의 동물 6이 포함된다. 폐쇄는 사지 동물의 복강의 배쪽 부위에의 시험품 배치 [위에 놓인 복부 장기의 중량이 도관 폐쇄, 접착 및 누관 형성, 및 신장 합병증 (예를 들어, 확장, 염증, 및/또는 수뇨관 또는 신장의 감염)을 유발할 수 있음]에 의해 가능했던 것으로 나타났다. 폐쇄는, 아트리움 형성을 위한 복막 사용으로 인해 부분적 또는 완전한 요로 폐쇄와 후속적인 배설물 축적 및 박테리아 감염이 야기되어 악화되었다. 시험품의 수술적 배치는 모든 연구 동물에 있어서 동일하였고; 따라서, 폐쇄-관련 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘 (즉, 사지 동물의 해부학적 구조로 인해 복부 내장이 도관에 의지함)을 가졌다.

[0394] [표 3.2]

[0395]

| 동물 번호 | 군 | SMC 공급원 | 세포 시딩 밀도 ($x10^5$) | 수집된 지방 조직 (g) | 수집된 혈액 (ml) | 이식 일 (생검 후 일 수) | 스텐트 제거 | 연구 일 수 | 소인 | 사망 사건 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | PCV-2 | 폐쇄 |
| 1 | 1 | 지지체 단독 | 0 | 24 | 60 | 74 | 2주째 (1) 및 4주째 (1) | 47 | UD | | X |
| 2 | 2 | 혈액 | 2.5 | 21 | 60 | 71 | 2주째 | 38 | UD | X | X |
| 3 | 2 | 혈액 | 2 | 30 | 60 | 72 | 부검시 | 40 | UD | | X |
| 4 | 2 | 혈액 | 2.5 | 25 | 60 | 71 | 2주째 | 83 | S | X | |
| 5 | 3 | 지방 | 2 | 34 | 60 | 73 | 3주째 | 28 | EE | | |
| 6 | 3 | 지방 | 2 | 22 | 60 | 73 | 2주째 (1) 및 3주째 (1) | 39 | UD | | X |
| 7 | 3 | 지방 | 2.5 | 21 | 60 | 72 | 4주째 | 63 | UD | X | |

[0396] 30일이 지난 후의 임상적 건강 관찰 및 수술후 치유. 30일이 지난 후에는 6마리의 동물이 연구되었다 (28일 째에 군 3의 동물 5를 선출적으로 안락사시킴). 한가지 중요한 임상적 관찰은 소변 배출의 간헐적 폐쇄였다. 이식후 처음 30일 동안 지지체의 생분해가 일어났기 때문에, 폐쇄는 사지 동물의 복강의 배쪽 부위에의 시험품 배치 [위에 놓인 복부장기의 중량이 도관 폐쇄, 접착 및 누관 형성, 및 신장 합병증 (예를 들어, 확장, 염증, 및/또는 수뇨관 또는 신장의 감염)을 유발할 수 있음]에 의해 가능했던 것으로 나타났다. 폐쇄는, 아트리움 형성을 위한 복막 사용으로 인해 부분적 또는 완전한 요로 폐쇄와 후속적인 배설물 축적 및 박테리아 감염이 야기되어 악화되었다. 따라서, 31일째부터 부검시까지 6마리의 생존 동물에 대해 스토마 유지를 계속하였다. 이를 31일째부터 부검시까지 통틀어 최소 4회 및 최대 13회 수행하였다. 6마리의 동물 중 2마리가 30일째 이후에 식욕부진을 나타냈다 (군 1의 동물 1 및 군 3의 동물 7). 6마리의 동물 중 3마리가 30일째 이후에 기면상태로 나타났다. 처음 30일 중에 기면상태를 나타낸 2마리의 동물이 30일째 이후에 기면상태를 지속적으로 나타냈다 (군 1의 동물 1 및 군 2의 동물 4). 처음 30일 중에 기면상태를 나타내지 않았던 1마리의 동물이 30일째 이후에 기면상태를 나타냈다 (군 3의 동물 6). 하기 표 3.4에 군별 임상적 건강 관측 및 수술후 치유를 나타내었다 (이식 후 > 30일).

[0397] [표 3.4]

| 임상적 관찰 | 군 1 N=1 | 군 2 N=3 | 군 3 N=2* | 총 N=6 |
|---|---|---|---|---|
| 스토마 포트 보수 | 1/1 | 3/3 | 2/2 | 6/6 |
| 식욕부진 (먹지 않음, 야윔) | 1/1 | 0/3 | 1/2 | 2/6 |
| 기면상태 | 1/1 | 1/3 | 1/2 | 3/6 |

[0398] *군 3의 동물 5는 28일째에 선출적으로 안락사시킴

[0399] 스텐트 제거. 스텐트를 이식후 2주 내지 4주 사이에 안락사시킨 동물로부터 스텐트 테터 또는 초음파에 의한 가시화, 및 복강경에 의한 회수에 의해 제거하였다. 1마리의 동물 (군 2의 동물 3)에서의 스텐트는 가시화 및 제거가 불가능하였고, 부검시까지 제자리에 유지시켰다. 개별 수뇨관 스텐트 제거 데이터를 수집하였다 (데이터는 제시하지 않음).

[0400] **스토마 포트/카테터.** 개별 데이터를 수집하였다 (데이터는 제시하지 않음). 스토마 관리를 최적화하기 위해 연구 중에 변화의 진행이 있었다. 초기에는 폴리 카테터를 이용하였다. 이를 트라코에(TRACOE)(등록상표) 스토마 포트로 대체하였다. 이것이 빈번한 장치 제거로 인해 동물에 대해 실행불가능한 것으로 입증된 경우, 소변 배출을 돕기 위해 8Fr 폴리 카테터를 이용하였다. 이후에 이를 막힘 감소를 위해 보다 큰 직경을 갖는 변형된 연장 세트 튜빙(extension set tubing)으로 대체하였다. 보수 또는 대체는 매주, 그리고 필요에 따라 수행하였다.

[0401] **체중.** 모든 동물은 이식후 체중이 감소되었다. 연구 진행 중에 모든 동물에 대한 체중이 변동하였다. 1마리의 동물 (군 2의 동물 4)이 계획된 희생시까지 생존하였고, 2주째로부터 부검시까지 체중이 변함없이 유지되거나, 또는 체중이 증가하였다. 개별 체중 데이터를 하기 표 3.5에 나타내었다.

[0402] **임상 병리.** 개개의 동물에 대한 임상 병리 데이터를 수집하였다.

[0403] **혈액학.** 혈액학 데이터를 수집하였다 (데이터는 제시되지 않음). 혈액학을 위한 수술후 혈액 수집은 모든 군에서의 백혈구증가증 발생을 밝혀내었다. 모든 군에서의 백혈구 수는 변동적이었지만, 지지체-단독 동물 (군 1)의 백혈구 수가 부검시에 가장 높은 값을 가졌다. 적혈구 수 (RBC)는 모든 군에서 변동적이었지만, 연구 기간 내내 참조 범위 (8 내지 10 MILL/㎕ 내에서 유지되었다. 적혈구용적률 (%)은 모든 군에서 연구 기간에 걸쳐 변동적이었다.

[0404] **혈청 화학.** 혈청 화학 데이터를 수집하였다 (데이터는 제시되지 않음). 전체적으로, BUN, 크레아티닌, 전체 단백질 및 칼륨은 모든 동물에서 부검시에 증가되었다. 알부민은 일반적으로 부검시에 감소되었고, 칼륨 및 나트륨은 변동적이었다. 모든 군에서 변화가 명백했지만, 지지체-단독 동물 (군 1)이 부검시에 가장 유의한 변화를 갖는다고 여겨졌다.

[0405] **응고.** 응고 데이터를 수집하였다 (데이터는 제시되지 않음). 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간은 증가되었다가 이후에 동물 5 및 7을 제외한 모든 동물에서 부검시에 거의 기저수준으로 돌아왔고, 동물 5 및 7은 여전히 증가된 상태로 유지되었다. 피브리노겐은 모든 군에서 부검시에 증가되었고, 지지체-단독 동물에서 가장 높았다.

[0406] **소변검사.** 소변검사 데이터를 수집하였다 (데이터는 제시되지 않음). 소변검사 데이터는 모든 군에서 기저시점과 부검 사이에 단백질, 혈액 존재, 백혈구 수 및 박테리아 수가 증가했음을 보여주었다.

[0407] **영상화.** 초음파 데이터를 하기 표 3.6에 나타냈다.

[0408] [표 3.5]

| 동물 번호 | 임플란트 유형 | 기저 시점 | 제1주 | 제2주 | 제2주 | 제3주 | 제4주 | 제5주 | 제6주 | 제7주 | 제8주 | 제9주 | 제12주 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 지지체-단독 | 17.8 | 16.3 | 16.4 | 15.2 | 15.4 | 16.1 | NP | 15.7 | 14.95 | NA | | |
| 2 | 혈액 유래의 SMC | 20.1 | 19.1 | NP | 17.4 | 16.5 | 17.9 | 15.9 | | | | | |
| 3 | 혈액 유래의 SMC | 17.4 | 15.9 | 16.3 | 16.3 | 16.6 | 17.25 | NP | 18.1 | NP | 19.6 | 19.8 | 19 |
| 4 | 혈액 유래의 SMC | 17.4 | 15.5 | 16.1 | NP | 17.1 | 19.3 | 18.1 | | | NA | | |
| 5 | 지방 유래의 SMC | 18.6 | 16.9 | 15.7 | 14.4 | 15.5 | 14.9 | NP | NP | NP | 16.65 | 13.4 | NA |
| 6 | 지방 유래의 SMC | 17.1 | 16.6 | 16.2 | 16.1 | 15.4 | 16.6 | NP | 17.2 | NA | | | |
| 7 | 지방 유래의 SMC | 16.9 | 15.1 | 14.3 | 13.7 | 12.5 | 11.3 | NA | | | | | |

[0409]

[0411] [표 3.6]

| | 동물 번호 | 군유형 | 제2주 | | | | | | 제4주 | | | | | | 제8주 | | | | | | 제12주 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 우측신장 | | 좌측신장 | | 도관 벽 두께 | | 우측신장 | | 좌측신장 | | 도관 벽 두께 | | 우측신장 | | 좌측신장 | | 도관 벽 두께 (cm) | | 우측신장 | | 좌측신장 | | 도관 벽 두께 | |
| | | | L | W | L | W | | | L | W | L | W | | | L | W | L | W | | | L | W | L | W | | |
| 1 | 1 | 지지체-단독 | 5.67 | 3.04 | 5.49 | 2.79 | 0.236 | | 4.55 | 2.71 | 7.09 | 4.36 | 0.132 | | NA | | | | | | NA | | | | | |
| 2 | 2 | 혈액 유래 | 4.52 | 3.33 | 5.55 | 3.96 | 0.139 | | 9.45 | 3.54 | 8.08 | 3.59 | 0.16 | | NA | | | | | | NA | | | | | |
| 4 | 4 | 혈액 유래 | 5 | 2.91 | 6.23 | 3.94 | 0.272 | | 10.5 | 4.31 | 5.2 | 3.49 | 0.17 | | 8.05 | 3.32 | 7.05 | 4.85 | 0.22 | | 7.16 | 4.19 | 8.33 | 3.59 | 0.242 | |
| 3 | 3 | 혈액 유래 | 4.5 | 2.57 | 5.87 | 3.2 | 0.172 | | 6.47 | 3.7 | 5.39 | 3.18 | 0.176 | | NA | | | | | | NA | | | | | |
| 6 | 6 | 지방 유래 | 4.33 | 3.07 | 5.67 | 3.58 | 0.171 | | 11.7 | 5.37 | 7.09 | 4.47 | 0.334 | | NA | | | | | | NA | | | | | |
| 5 | 5 | 지방 유래 | 5.18 | 3.26 | 5.63 | 2.77 | 0.246 | | 4.1 | 2.1 | 5.08 | 2.76 | 0.147 | | NA | | | | | | NA | | | | | |
| 7 | 7 | 지방 유래 | 4.82 | 2.62 | 3.57 | 2.14 | 0.233 | | 10.2 | 3.5 | 7.09 | 3 | 0.403 | | 7.51 | 4.4 | 7.09 | 3.31 | 0.211 | | NA | | | | | |

[0412]

[0413] 도 31 내지 43은 대표적인 방광경검사 영상을 보여준다. 도 31은 군 1의 동물 1의 제4주 세포검사 영상을 보여준다 (세포-무함유 지지체 이식). 도 32는 제6주 체크시 부검 2일 전의 동일 동물을 보여준다.

[0414] 도 33은 군 2의 동물 2의 부검전 세포검사 영상을 보여준다 (혈액 유래의 SMC가 접종된 지지체).

[0415] 도 34 내지 36은 군 2의 동물 3의 제4주, 제5주 및 부검전 세포검사 영상을 보여준다 (혈액 유래의 SMC가 접종된 지지체).

[0416] 도 37은 군 2의 동물 4의 부검전 세포검사 영상을 보여준다 (혈액 유래의 SMC가 접종된 지지체).

[0417] 도 38은 군 3의 동물 5의 제3주 세포검사 영상을 보여준다 (지방 유래의 SMC가 접종된 지지체). 상기 영상은 지지체 잔해의 백색-황갈색의 무정형 과립상 틀로 덮인 점막을 보여준다. 도 39는 동일 동물의 제3주 영상을 보여준다. 요관 문합 근처 또는 요관 문합에서의 분홍빛 초점은 스텐트 제거시에 상피가 떨어져서 분홍색의 혈관화된 과립화 층이 남아있음을 나타낸다.

[0418] 도 40 내지 42는 군 3의 동물 6의 제3주, 제4주 및 부검전 세포검사 영상을 보여준다 (지방 유래의 SMC가 접종된 지지체).

[0419] 도 43은 군 3의 동물 7의 제4주 세포검사 영상을 보여준다 (지방 유래의 SMC가 접종된 지지체). 2개의 스텐트 (청색 물질)는 처음에는 초음파 영상화시에 나타났고, 이후에는 세포검사 지침에 따라 제거되었다.

[0420] **초음파.** 개개의 초음파검사 데이터 및 군 초음파검사 데이터를 상기 표에 제시했다. 연구 기간 동안 수행된 신장에 대한 초음파검사는 모든 처리군에서의 신장 변화 (수신증)를 나타내는 표면적 (길이×폭)의 증가를 보여주

었다.

[0421] 임플란트 벽 두께에 대한 초음파검사는 모든 군에서 두께의 변동을 보여주었다. 하기 표 3.8은 이것을 예시한다.

[0422] [표 3.8]

| 도관 벽 두께 (cm) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 군 번호 | 군 유형 | 동물 번호 | 제2주 | 제4주 | 제8주 | 제12주 |
| 1 | 지지체-단독 | 1 | 0.236 | 0.132 | NA | NA |
| 2 | 혈액 유래 | 2 | 0.139 | 0.160 | NA | NA |
| 2 | 혈액 유래 | 3 | 0.272 | 0.170 | 0.220 | 0.242 |
| 2 | 혈액 유래 | 4 | 0.172 | 0.176 | NA | NA |
| 3 | 지방 유래 | 5 | 0.171 | 0.334 | NA | NA |
| 3 | 지방 유래 | 6 | 0.246 | 0.147 | NA | NA |
| 3 | 지방 유래 | 7 | 0.233 | 0.403 | 0.211 | NA |

[0423]

[0424] 병리학 보고는 하기 실시예 4에 기재했다.

[0425] 돼지 써코바이러스 유형-2 (PCV-2) 감염의 증거가 3/7 동물에서 관찰되었다. 이들은 제38일에 안락사시킨 군 2의 동물 2 및 제63일에 안락사시킨 군 3의 동물 7을 포함하였다. PCV-2 감염이 확인된 세번째 동물인 군 2의 동물 4는 고의로 희생시킬 때까지 생존하였다 (제83일). 도관 및 스토마를 통한 요류의 폐쇄는 4/6의 계획되지 않은 동물 사망의 이환율에 기여하였다. 이들은 제47일에 안락사시킨 군 1의 동물 1, 제38일 및 제40일에 안락사시킨 군 2의 동물 2 및 3, 및 제39일에 안락사시킨 군 3의 동물 6을 포함하였다. 수술로 이식된 시험품이 복부에 위치한 것은, 위에 놓인 복부 기관의 중량이 도관 폐쇄, 접착 및 누관 형성 및 2차 상부 요로 신장 합병증 (예를 들어, 요관 또는 신장의 확장, 염증 및/또는 감염)에 기여하는 사지 동물 모델에서의 요류의 물리적 폐쇄에 기여하였다. 또환, 요류 폐쇄는 복막의 사용으로 아트리움이 형성되면서 악화되었고, 부분적 또는 완전한 요로 폐쇄 및 이후의 배설물 축적 및 박테리아 감염을 야기하였다. 수술에 의한 시험품의 배치는 모든 연구 동물에서 동일하였기 때문에, 폐쇄-관련 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘을 가졌다. 비뇨기-유사 조직의 재생은 불과 제28일에 명백했고, 선택적으로 안락사시킨 동물 (군 3의 동물 5, 지방 유래의 SMC)의 요관-도관 접합부 (UCJ)에서 요로상피, 고유판 및 평활근 다발이 존재하였다. 임플란트의 요관 말단에서의 재생 과정은 구축 임플란트를 수용한 동물 (군 2 및 3) 사이에서 유사한 비뇨기-유사 조직 형성을 유도하였다. 상기 구조물 군 (군 2 및 3)에서 비뇨기-유사 조직 재생의 정도는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다. 계획적인 희생시까지 생존한 1마리 동물 (군 2의 동물 4, 제83일)은 바이러스 감염이 검출되었음에도 불구하고 UCJ, 상기 도관의 앞부분 및 중간 부분에서 요로상피 및 평활근이 존재하였다. 그러나, 복막 단독 아트리움은 비뇨기-유사 조직 재생을 지지하기에 불충분했고, 아트리움 내에서 형성된 조직은 요로상피 점막 내층 없이 섬유성 결합 조직으로 이루어진 벽을 가졌다. 도관에서 아트리움으로의 전이 지점은 동물들마다 달랐는데, 이것은 임플란트의 뒤쪽 말단이 복막의 랩핑 내에 자유롭게 떠 있어서 도관에서 아트리움으로의 전이를 부검시에 규정하기 어렵게 만들었기 때문이다. (추정적인) 뒤쪽 도관의 전형적인 조성물은, 결합된 섬유모세포 및/또는 근섬유모세포와 함께 조직화된 콜라겐이었다. 복막 아트리움은 비뇨기-유사 조직 재생에 불충분하다고 여겨지지만, NUC 임플란트로의 혈관증식 공급원으로 기능한다.

[0426] **결론.** 본 연구에서 모든 동물이 수술로부터 회복되고 요로 전환술이 달성되었기 때문에 돼지 동물 모델은 본 연구에서 네오-요로관의 수술적 적용을 평가하는데 적절한 것으로 입증되었다. 또한, 돼지 모델은 요류 폐쇄의 수술후 치유 및 상부 요로에 대한 영향을 평가하는데 적절했다. 마지막으로, 돼지 모델은 배설물 축적 및 박테리아 콜로니화, 바이러스 감염, 및 장 접착 및 누관으로 복잡해진 환경에서 시험품이 비뇨기-유사 조직을 재생시키는 능력을 평가하는데 적절했다.

[0427] 사지 동물의 복부 바닥에서의 요로 전환술의 해부학적 배치가 소변 배출의 부분적인 폐쇄를 야기했지만, 상기 수술 방법은 성공적이라고 결정되었다. 상기 동물 모델은 네오-요로관의 수술적 적용, 수술후 치유 및 기능성을 평가하는데 적절하다고 여겨졌다.

[0428] 이식술 후 처음 30일 동안의 수술후 관찰은 돼지에서의 요로 전환술 수술 후에 통상적이지 않다고 여겨지지 않았던 것을 밝혀냈다.

[0429] 실시예 4 - 네오-요로관 구조물 이식 후의 동물의 병리학

[0430] 실시예 3에서 기재된 연구의 결론으로, 시험 동물의 해부학적 병리를 평가하였다.

[0431] **조직 수집.** 복강을 개방하고, 도관 (즉, 구조물 또는 지지체-단독 시험품을 이식한 결과)을 가시화하여 동물 실험실에서 계내 디지털 사진을 찍었다. 도관을 신장 및 요관과 함께 제거하였다. 요관을 문합으로부터 3 내지 4 cm 떨어져 횡단 절개함으로써 도관으로부터 분리시켰다. 신장, 요관, 림프절, 및 전체적으로 관찰된 임의의 다른 병변의 대표적인 절편을 수득하였다. 모든 조직 샘플을 10% 중성 완충된 포르말린 (NBF) 중에 24시간 내지 48시간 동안 넣어 두었다가 조직학적 프로세싱 및 평가를 위해서 베트 패쓰 서비시즈, 인크.로 보냈다.

[0432] **조직학적 프로세싱.** 고정 후에, 도 44에서 예시된 바와 같이 도관을 종방향으로 (배출과 평행하게) 개방하고 등쪽 절반과 배쪽 절반으로 나누었다.

[0433] 3개의 횡단면을 각 절반으로부터 트리밍하였다 (앞쪽, 중간 및 뒤쪽 절편을 등쪽 절반 및 배쪽 절반에서 포획함). 각 절반으로부터의 1개의 절편을 도관-아트리움 연결부로부터 취하였다. 추가의 절편을 2개의 요관-도관 접합부 각각에서 취하였다. 1개의 다른 슬라이드를 사용하여 피부 표면의 스토마 및 복부 벽을 통한 인접관을 포획하였다. 도관의 크기가 허용된다면 이러한 절차로 11개의 슬라이드가 생성되었다. 절편들을 각 동물로부터 수집하였다. 또한, 하기하는 조직/장기 절편을 수득하고, 조직학 분석을 실시하였다: 좌측 신장, 우측 신장, 좌측 요관, 우측 요관, 허리 림프절, 장간막 림프절, 서혜 림프절 및 임의의 육안 병변.

[0434] VPS에서의 조직 트리밍 동안, 예시 목적을 위해 디지털 사진을 찍었다. 고정 후, 조직을 마이크로슬라이드로 통상적으로 프로세싱하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 및 마손 3색으로 염색하였다. 또한, 신장 및 5개 도관 부위의 슬라이드를 브라운 앤드 홉스(Brown and Hopps) (그램(Gram)) 염색으로 염색하였다. 슬라이드를 현미경으로 평가하였다.

[0435] 적절한 경우, 개개의 동물 데이터를 위한 현미경 관찰결과를 획득하고 스코어링하였다.

[0436] 결과

[0437] 사망률. 동물은 28-83일 생존하였다. 7 동물 중 1 마리는 계획적인 희생시까지 생존하였다 (군 2의 동물, 제83일). 7 동물 중 6 마리는 비계획적으로 희생되었다: 군 3 동물을 조직병리학적 분석을 위해 이식 후 제28일에 선택적으로 안락사시켰고, 5 마리의 동물은 불량한 임상 상태로 인해 이식 후 제38일 내지 제 63 일 사이에 안락사시켰다 (1 마리의 군 1 동물; 2 마리의 군 2 동물; 및 2 마리의 군 3 동물). 이러한 비계획적인 사망은 모든 처리 군에서 발생하였고, 이는 바이러스 감염 및/또는 상부 요로가 손상된 폐쇄 관련 병리로 인한 것이었다. 7 마리의 각각의 동물에 대한 최종 처분 및 사망률 결과를 부록 1, 동물 정보편에 나타내었다. 처분 (사망률 분류)은 하기 표 4.2에 처리 군별로 요약하였다 (군 1 = 지지체 단독, 군 2 = 혈액 유래 SMC 구조물, 군 3 = 지방 유래 SMC 구조물).

[0438] [표 4.2]

[0439]

| 군별 비계획적인 사망 및 계획적인 사망 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 사망률 | 군 1<br>N=1 | 군 2<br>N=3 | 군 3<br>N=3 | 총<br>N=7 |
| 비계획적인 부검 (안락사) | 1/1 | 2/3 | 3/3* | 6/7 |
| 계획적인 부검 | 0/1 | 1/3 | 0/3 | 1/7 |

[0440] *폐쇄.* 도관 및 스토마를 통한 요류의 폐쇄는 4/6 비계획적인 사망 동물에서 이환율의 원인이 되었다. 여기에는 제47일에 안락사시킨 군 1의 동물 1; 제38일 및 제40일에 안락사시킨 군 2의 동물 2 및 3; 및 제39일에 안락사시킨 군 3의 동물 6이 포함된다. 수술에 의해 이식되는 시험품의 복부 위치결정은 사지 동물 모델에서 요류의 물리적 폐쇄의 원인이 되었고, 이때 복부 기관 위에 놓이는 중량은 도관 폐쇄, 부착 및 누관 형성, 및 2차 상부 요로 신장 합병증 (예를 들어, 수뇨관 또는 신장의 확장, 염증, 및/또는 감염)의 원인이 되었다. 또한, 요류 폐쇄는 아트리움을 형성하기 위해 복막을 사용하는 것에 의해 악화되어, 부분적인 또는 완전한 비뇨기 폐쇄에 이어 배설물 축적 및 박테리아성 감염을 야기하였다. 시험품의 수술에 의한 배치는 모든 연구 동물에서 동일하였고; 따라서, 폐쇄-관련 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘을 가졌다.

[0441] 시험품의 이식으로부터 형성되는 도관은 크기 및 모양이 변하기 쉬운 튜브로 복부의 복막하 공간에 위치시켰다. 수뇨관은 도관의 앞쪽 말단에서 시작되었다 (수뇨관-도관 접합부, UCJ, 도 44). 요류는 복막-랩핑 임플란트 및 아트리움을 통과하였고, 스토마로 빠져나왔다. 도관의 앞쪽 말단 (수뇨관 부착점)은 게실이라 불리는 양측 구상 확장을 빈번하게 가졌고, 이는 재생 과정의 일부인 것으로 보이며, 재생 도관에서의 확장을 야기하는 스토마

및 역압의 간헐적 폐쇄를 반영하였다.

[0442] 부착 및 누관. 도관의 복면은 복벽의 근막 및 골격근에 부착되었고, 배면은 복막으로 덮였다. 부검시, 도관 또는 수뇨관 및 다른 복부 기관 (예를 들어, 위장관, 그물막 또는 다른 복부 기관) 사이의 부착이 관찰되었다. 도관의 내강은 배설물로 채워졌다. 다양한 복부 기관 사이에서의 부착 및 도관과 복부 기관 사이에서의 부착을 비롯한 복부 부착은 7/7 동물에서 존재하였다.

[0443] 7 동물 중 6 마리는 도관과 장 사이의 부착을 가졌다 (거시적 및 미시적으로 군 1의 동물 1; 군 2의 동물 3 및 4 및 군 3의 동물 6 및 7에서; 미시적으로 군 2의 동물 2에서). 또한 7 동물 중 1 마리는 도관과 자궁 사이 및 수뇨관에서 자궁 또는 난소까지 거시적인 부착을 가졌다 (군 2의 동물 4). 1 마리의 동물 (군 3의 동물 5)은 수뇨관과 자궁 또는 난소 사이에 부착을 가졌다 (거시적). 7 동물 중 1 마리는 수뇨관에서 자궁 또는 난소까지 및 수뇨관에서 장까지 거시적인 부착을 가졌다 (군 3의 동물 6). 누관은 거시적으로 관찰되었고, 누관/호중구 관은 2/7 동물 (군 2의 동물 2 및 3)에서 도관과 장관 사이에서 미시적으로 관찰되었다. 누관은 거시적으로 관찰되었고, 누관/호중구 관은 2/7 동물 (군 2의 동물 2 및 3)에서 도관과 장관 사이에서 미시적으로 관찰되었다.

[0444] 수뇨관 및 신장. 현미경 평가시에 몇몇 기본적인 생물학적 과정의 결과로 두꺼워진 수뇨관이 거시적으로 관찰되었다. 수뇨관 확장 (또는 수뇨관증)은 정상 수뇨관벽 구조를 가지면서 확장된 내강을 특징으로 하였다. 수뇨관은 또한 때때로 수뇨관 주변 장간막의 아급성/만성 염증에 의해 두꺼워졌고, 이는 수뇨관 주위의 장간막이 콜라겐 및 섬유모세포, 때로는 림프구 및 대식세포에 의해 확장될 때 발생하였다. 이행 세포 공포형성은 상피에서의 둥글고 투명한 공포를 특징으로 하였다. 이 염증은 통상적으로 근육층 또는 수뇨관의 요로상피에 영향을 미치지 않았다. 수뇨관 주변 염증은 수뇨관과 장 또는 생식 기관 사이의 부착과 관련이 있을 수 있지만; 이는 또한 부착없이 일어날 수 있다. 혈관이 괴사되거나 괴사되지 않은 혈관염이 수뇨관 주변 염증 영역 내에서 관찰되었다. 이는 군 2의 동물 2에서의 PCV-2 바이러스 감염과 관련이 있을 수 있다. 미시적으로, 수신증은 가늘어지는 신우의 확장 및 신피질의 만성 염증 (섬유증, 림프구, 형질 세포 및 때때로 대식세포)을 특징으로 하였다. 수신증은 하부 비뇨기계 (수뇨관, 도관 또는 아트리움/스토마)에서의 완전하거나 부분적인 장애의 결과인 것으로 여겨진다. 때때로 수신증과 관련된 만성 활성 신우신염은 신우로의 호중구 및 세포 잔해의 침투 (종종 원위 속질로 퍼져나감)를 특징으로 하였다. 신우신염은 신우로 올라가는 하부 요로의 바이러스 감염의 결과였다. 만성 신장염 (수신증 제외)은 신피질 또는 속질에 염증성 세포 (림프구, 대식세포, 형질 세포 및 때때로 호중구)가 침투한 섬유증을 특징으로 하였다. 만성 신장염에 걸린 신장의 피질은 수신증/만성 신장염에 걸린 동물에서의 그것과 유사하게 보였지만; 만성 신장염에서는 골반이 확장되지 않았다. 만성 활성 신장염은 만성 신장염과 외관이 유사하였지만, 호중구가 상당히 침투한 것이다. 세뇨관 괴사/체액/원주/사구체신염은 사구체 내 호중구, 림프구 및 대식세포, 개개의 세뇨관 상피 세포의 괴사, 단백질성 세뇨관 원주 및/또는 세뇨관 내강에서의 출혈을 특징으로 하는, 한 무리의 변화이다. 세뇨관 괴사/체액/원주/사구체신염은 군 2의 동물 2 및 4 및 군 3의 동물 7에서 관찰되었다. 또한, 세뇨관 괴사/체액/원주/사구체신염 동물의 신장에서의 공통점은 혈관염/혈관 주위 염증이었다. 피막/복막의 만성 활성 염증은 섬유모세포, 콜라겐 섬유 및/또는 피브린, 호중구, 림프구 및 대식세포에 의해 신장의 피막이 두꺼워지는 것을 특징으로 하였고, 복막염의 징조였다.

[0445] 일측성 수뇨관증 (2/7 동물): 군 1에서의 1 동물 (동물 1) 및 군 3에서의 1 동물 (동물 6). 이측성 수뇨관증 (2/7 동물): 군 2에서의 1 동물 (동물 2) 및 군 3에서의 1 동물 (동물 5). 일측성 수신증 (2/7 동물): 군 3에서의 2 동물 (동물 5 및 6). 이측성 수신증 (2/7 동물): 군 1에서의 1 동물 (동물 1) 및 군 2에서의 1 동물 (동물 2). 신우신염 (이측성)은 7 동물 중 1 마리; 군 2 (동물 2)에서 관찰되었다. 계획적인 희생시까지 생존한 1 마리의 동물 (군 2 동물 4, 제 83일)은 수뇨관증, 수신증 또는 신우신염을 가지지 않았다.

[0446] 요로관의 재생과 관련된 결과. 수거한 각각의 절편에서 관찰된 조직 성분의 상세한 결과를 수집하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0447] 도관 재생 결과에 대한 군 간 발생정도를 하기 표에 나타내었다. 하기 표 4.17은 NUC 결과의 요약을 군별로 나타내었다.

[0448] [표 4.17]

| 군: 처리: | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| | 지지체 단독 | 자가 혈액 SMC | 자가 지방 SMC |
| 연구 평균 일수: | 47 | 54 | 43 |
| 도관 위치에 의한 선택 결과의 발생정도 (결과를 가진 동물의 수/그 위치에서 조사된 동물의 수) | | | |
| 요로상피의 존재 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 1/1 | 1/3 | 3/3 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 0/1 | 1/3 | 3/3 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 0/1 | 1/3 | 0/3 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 0/1 | 1/3 | 0/3 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움 (슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 아트리움/도관에서의 편평상피의 존재 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움 (슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 0/1 | 1/3 | 0/3 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 0/1 | 2/3 | 1/3 |
| 평활근 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 1/1 | 0/3 | 1/3 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 0/1 | 1/3 | 1/3 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 0/1 | 1/3 | 0/3 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 0/1 | 1/3 | 0/3 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움 (슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 0/1 | 0/3 | 0/3 |
| 만성 활성 염증/배설물의 표면 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 0/1 | 3/3 | 1/3 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 1/1 | 2/3 | 1/3 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 1/1 | 3/3 | 3/3 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 1/1 | 3/3 | 3/3 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움 (슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 1/1 | 3/3 | 3/3 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 1/1 | 3/3 | 2/3 |
| 감쇠, 요로상피 | 1/1 | 0/3 | 2/3 |
| 과형성, 요로상피 | 0/1 | 1/3 | 1/3 |
| 공포형성, 요로상피 | 0/1 | 0/3 | 1/3 |
| 출혈, 도관벽 | 1/1 | 1/3 | 1/3 |
| 지지체 물질, 도관벽 | 0/1 | 0/3 | 2/3 |
| 콜라겐 증가, 지지체 벽 | 1/1 | 0/3 | 0/3 |
| GI 관 부착 (P = 존재함) | 0/1 | 2/3 | 0/3 |
| 장으로의 누관/호중구 관 | 0/1 | 2/3 | 0/3 |
| 가시세포증, 피부, 스토마 | 0/1 | 2/3 | 1/3 |
| 브라운 및 홉스 그람 염색 | | | |
| 배설물 내 그람 양성 박테리아 | 1/1 | 3/3 | 3/3 |
| 배설물 내 그람 음성 박테리아 | 1/1 | 3/3 | 3/3 |

[0449]

[0450] 하기 표 4.18은 NUC 결과의 요약을 군 (비-PCV-2 동물)별로 나타내었다.

[0451] [표 4.18]

| 군 : 처리: | 1<br>지지체 단독 | 2<br>자가 혈액<br>SMC | 3<br>자가 지방<br>SMC |
|---|---|---|---|
| 연구 평균 일수: | 47 | 40 | 34 |
| 도관 위치에 의한 선택 결과의 발생정도(결과를 가진 동물의 수/그 위치에서 조사된 동물의 수) | | | |
| 요로상피의 존재 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 1/1 | 0/1 | 2/2 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 0/1 | 0/1 | 2/2 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움(슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 아트리움/도관에서의 편평상피의 존재 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움(슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 0/1 | 1/1 | 0/2 |
| 평활근 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 1/1 | 0/1 | 1/2 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 0/1 | 0/1 | 1/2 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움(슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 만성 활성 염증/배설물의 표면 | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 14) | 0/1 | 1/1 | 1/2 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 16) | 1/1 | 1/1 | 1/2 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 또는 10) | 1/1 | 1/1 | 2/2 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 또는 11) | 1/1 | 1/1 | 2/2 |
| 도관체 뒤쪽/아트리움(슬라이드 8, 9, 12 또는 13) | 1/1 | 1/1 | 2/2 |
| 아트리움-스토마-피부 접합부 (슬라이드 18) | 1/1 | 1/1 | 1/2 |
| 감쇠, 요로상피 | 1/1 | 0/1 | 2/2 |
| 과형성, 요로상피 | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 공포형성, 요로상피 | 0/1 | 0/1 | 0/2 |
| 출혈, 도관벽 | 1/1 | 0/1 | 1/2 |
| 지지체 물질, 도관벽 | 0/1 | 0/1 | 2/2 |
| 콜라겐 증가, 지지체 벽 | 1/1 | 0/1 | 0/2 |
| GI 관 부착 (P = 존재함) | 0/1 | 1/1 | 0/2 |
| 장으로의 누관/호중구 관 | 0/1 | 1/1 | 0/2 |
| 가시세포증, 피부, 스토마 | 0/1 | 1/1 | 1/2 |
| 브라운 및 홉스 그람 염색 | | | |
| 배설물 내 그람 양성 박테리아 | 1/1 | 1/1 | 2/2 |
| 배설물 내 그람 음성 박테리아 | 1/1 | 1/1 | 2/2 |

[0452]

[0453] 시험품의 수술적 이식 후에 발달된 도관은 수뇨관 (앞쪽 말단)으로부터 임플란트 및 아트리움을 지나 복부 피부의 스토마 개구부로 진행되는 중심 관강으로 구성되었다. 구조물 군 (군 2 및 3)에서의 비뇨기-유사 조직 재생의 범위는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다. 동물을 이식후 다양한 시점에 안락사시켰기 때문에, 관찰된 재생 과정은 다양한 단계에 있었으며, 각각의 군에 존재하는 비뇨기-유사 조직의 범위는 이식후 시간, 및 SMC의 존재 또는 부재에 기반하여 달랐다.

[0454] 수뇨관-도관 접합부, 도관의 앞쪽 및 중간-부분. 수뇨관-도관 접합부 (UCJ; 도 44의 절편 14 및 16)를 포함하는 도관의 앞쪽 말단 근처에 있는 조직의 전형적인 조성물은 가변-크기의 점막하층, 및 산재된 결합 조직을 갖는 평활근 섬유의 층 위에 놓인 요로상피였다 (도 27-28).

[0455] 도 45는 상단 패널에서 군 3의 동물 6 (지방 유래의 SMC), 및 하단 패널에서 군 1의 동물 1의 서브그로스 사진을 보여준다.

[0456] 도 46은 군 2의 동물 4 (혈액 유래의 SMC)로부터의, 수뇨관-도관 접합부 근처의 네오-요로관의 현미경사진 (마손 3색 염색)을 보여준다. 요로상피가 얇은 점막하층 및 평활근 층 위에 명백하게 나타난다.

[0457] 도 47은 군 3의 동물 6 (지방 유래의 SMC)으로부터의, 수뇨관-도관 접합부 근처의 네오-요로관의 현미경사진 (마손 3색 염색)을 보여준다. 요로상피가 얇은 점막하층 및 평활근 층 위에 명백하게 나타난다.

[0458] 도 48은 동물 1 (군 1) (좌측 패널) 및 동물 3 (군 2) (우측 패널)의 중간-도관 벽의 현미경사진 (마손 3색 염색)을 보여준다. 관강에 가장 근접한 중간-도관 벽은 종종 만성 활동성 염증으로 덮였다. 지지체 단독 (군 1) 동물의 벽은 주로 청색-염색된 콜라겐 (수복성)으로 만들어진 반면, 우측에 있는 구조물의 벽은 주로 (재생성) 적색-염색된 방추 세포 (아마도 근세포, 섬유모세포 및 근섬유모세포)로 만들어졌다.

[0459] 계획적인 희생시까지 생존한 동물에서, 앞쪽 및 중간 도관 부분은 외관상 유사하였다. 도관 내에 요로상피 및 평활근 계층화가 존재한 곳에서, 이들은 특히 게실 내에서 도관 벽 두께가 전형적으로 수뇨관의 그것보다 클지라도 형태학적으로 수뇨관과 유사하였다. 게실은 좌우 수뇨관-도관 접합부로부터 뒤쪽으로 돌출되는 도관의 2-구획성 부분으로 보였다. 요로상피의 전형적 외관은 공포를 다소 가지며(mildly vacuolated) 두께가 가변적이었다. 요로상피 두께는 (특히 큰 게실 내에서) 최소로 감쇄된 두께 내지 적당히 감쇄된 두께 사이에서 변화했고, 다소 과형성되었다.

[0460] 요로상피는 동물의 5/7 (군 1 중 1마리의 동물 (동물 1), 군 2 중 1마리의 동물 (동물 4), 및 군 3 중 3마리의 동물 (동물 5, 6 및 7))에서 수뇨관-도관 접합부 (UCJ; 도 44의 절편 14 및/또는 16)에 존재하였다 (표 4.19). 요로상피는 동물의 1/7 (군 2 중 1마리의 동물 (동물 4))에서 앞쪽 및 중간 부분 (도 44의 절편 6 및/또는 10; 도 44의 절편 7 및/또는 11)에 존재하였다. 평활근은 동물의 4/7 (군 1 중 1마리의 동물 (동물 1), 군 2 중 1마리의 동물 (동물 4), 및 군 3 중 2마리의 동물 (동물 5 및 6))에서 수뇨관-도관 접합부 (UCJ; 도 44의 절편 14 및/또는 16)에 존재하였다. 평활근은 동물의 1/7 (군 2 중 1마리의 동물 (동물 4))에서 앞쪽 및 중간 부분 (도 44의 절편 6 및/또는 10, 도 44의 절편 7 및/또는 11)에 존재하였다.

[0461] 비뇨기-유사 조직 재생의 범위는 이식후 시간에 따라 달랐다. 계획적인 희생시까지 생존한 1마리의 동물 (군 2의 동물 4, 제 83일)은 UCJ, 도관의 앞쪽 및 중간 부분에 존재하는 요로상피 및 평활근을 가지고 있었다.

[0462] 하기 표 4.19는 UCJ, 앞쪽 및 중간 도관에서의 요로상피 및 평활근의 발생빈도를 보여준다 (군 1 = 지지체 단독, 군 2 = 혈액 유래의 SMC 구조물, 및 군 3 = 지방 유래의 SMC 구조물).

[0463] [표 4.19]

| 소견 | 군 1 | 군 2 | 군 3 | 총계 |
|---|---|---|---|---|
| | N=1 | N=3 | N=3 | N=7 |
| **요로상피의 존재** | | | | |
| UCJ (슬라이드 14 및/또는 16) | 1/1 | 1/3 | 3/3 | 5/7 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 및/또는 10) | 0/1 | 1/3 | 0/3 | 1/7 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 및/또는 11) | 0/1 | 1/3 | 0/3 | 1/7 |
| **평활근의 존재** | | | | |
| UCJ (슬라이드 14 및/또는 16) | 1/1 | 1/3 | 2/3 | 4/7 |
| 도관체의 앞쪽 (수뇨관) 말단 (슬라이드 6 및/또는 10) | 0/1 | 1/3 | 0/3 | 1/7 |
| 도관체의 중간 (슬라이드 7 및/또는 11) | 0/1 | 1/3 | 0/3 | 1/7 |

[0464]

[0465] 도관의 뒤쪽 부분. 임플란트의 뒤쪽 말단이 복막으로 둘러싸인 내부에서 자유롭게 표류하기 때문에 도관으로부터 아트리움으로의 전이점은 동물 사이에서 달랐고, 이는 부검에서 도관으로부터 아트리움으로의 전이를 규정하기 어렵게 하였다. 절편 8 및 12 (뒤쪽 도관으로 추정됨, 도 44)의 전형적인 조성물은 결합된 섬유모세포 및/또는 근섬유모세포를 갖는 조직된 콜라겐이었다. 콜라겐성 벽의 내부, 및 관강에 가장 근접한 곳에는 느슨하게 배열된 콜라겐, 모세관, 및 풍부한 호중구와 보다 적은 림프구 및 대식세포로 구성된 만성 활동성 염증의 층이 있었다. 염증 내부에서, 관강은 종종 퇴화되거나 괴저성인 염증성 세포 (주로 호중구), 및 박테리아 콜로니와 혼합된 세포 잔해로 구성된 배설물로 채워져 있었다. 브라운 앤드 홉스 그람 염색에 의하면, 박테리아 콜로니는 그람 양성 및 그람 음성 둘 다였다. 그람 양성 박테리아 중 대부분은 구균이었으나, 구균, 및 그람 음성 및 그람 양성 간균이 둘 다 관찰되었다. 지지체 단독 동물 (군 1)은 한쪽 수뇨관 근처에서 단지 최소한의 재생만을 가졌으며, 도관체의 나머지는 최소한의 섬유모세포와 함께 거의 콜라겐 섬유 단독으로 구성되어 있었다. 구조물을 수용하는 동물 (군 2 및 3)에서는 재생이 더 광범위한 경향이 있었으며, 도관의 다른 부분에서 벽은 콜라겐, 섬유모세포 및 다른 방추 세포 (근섬유모세포 및 근세포로 추정됨)의 혼합물로 구성되어 있었다.

[0466] 도관의 아트리움 및 스토마 부분. 도관의 아트리움-스토마 말단 영역 (도 44의 절편 9, 13 및 18)에서, 스토마-아트리움 접합부는 스토마 진피의 조직된 콜라겐 및 부속기가 아트리움 벽에 인접한 곳에서 가시적이었다. 이들 절편은 주로 편평 상피 및 만성 활동성 염증/배설물로 구성되어 있었다. 동물의 3/7 (군 2의 동물 3 및 4, 및 군 3의 동물 7)에서, 피부의 편평 상피 (표피)가 아트리움 위로 짧은 거리만큼 앞쪽으로 확장되었다. 아트리움의 외부 표면은 복막 기원의 느슨한 결합 조직으로 구성되어 있었다. 이 외부 덮개는 장막 층에 상당하는 것이며, 신경, 혈관, 지방 조직, 및 섬유성 결합 조직 (콜라겐 섬유 및 섬유모세포)의 일부 영역을 함유하고 있

었다. 어떠한 동물에서도 도관의 아트리움-스토마 말단 (도 44의 절편 9, 13 및 18)에서의 비뇨기-유사 조직 재생의 증거는 없었다.

[0467] *기타 소견*. 동물의 2/7에서, 지지체 물질이 도관 벽에서 관찰되었다. 상기 물질은 군 3의 동물 5 (제28일)에서는 도관체의 모든 수준에서 관찰되었고, 군 3의 동물 6 (제39일)에서는 아트리움-도관 접합부에서만 관찰되었다.

[0468] 토의. 동물은 28 내지 83일 동안 생존하였다. 7마리의 동물 중 1마리가 계획적인 희생시까지 생존하였다 (군 2의 동물 4, 83일). 7마리의 동물 중 6마리는 계획에 없이 안락사시켰다 (동물 5 (군 3)를 조직병리학적 분석을 위해 이식후 제28일에 선택적으로 안락사시키고, 5마리의 동물을 불량한 임상 조건 때문에 이식후 제 38 내지 63일에 안락사시킴 (군 1의 동물 1; 군 2의 동물 2 및 3; 및 군 3의 동물 6 및 7)).

[0469] 도관 및 스토마를 통한 요류의 폐쇄가, 4/6의 계획에 없이 사망한 동물에서의 이환율에 기여하였다. 상기 동물에는 군 1의 동물 1 (제47일에 안락사시킴); 군 2의 동물 2 및 3 (제38일 및 제40일에 안락사시킴); 및 군 3의 동물 6 (제39일에 안락사시킴)이 포함되었다. 폐쇄는 시험품을 복부 내장의 중량이 임플란트를 압박하는 돼지의 복부 바닥을 따라 수술로 이식한 것, 및 도관을 피부로 연결하는 아트리움 구획을 형성하기 위한 복막의 사용이 외부 환경 및 소변 내의 점액 (돼지에 있어 정상임)으로부터의 배설물 축적을 초래한 것의 조합에 의해 유발되었다. 이러한 사지동물 모델에 고유한 관련 수술후 합병증에는 (i) 잠재적 누공 형성을 야기하는 복부 유착, 및 (ii) 복부 기관과 관련된 시험품 배치 위치가 포함된다. 유착된 기관이 장인 경우, 장의 유착된 구획의 근육층은 종종 아트리움 벽과 마찬가지로 유착점에서 감소되거나 짓물렀다. 시험품은 복막으로 둘러싸인 복부에 위치했고, 수뇨관으로부터 피부 표면까지 요로관을 형성하였다. 시험품은 수뇨관의 앞쪽 말단에 고정되었으나, 복막이 복벽을 통과하여 피부 표면 위로의 통로를 형성하는 뒤쪽 말단에서는 복막으로 둘러싸인 내부에서 자유롭게 표류하였다. 평활근 및/또는 요로상피 형성은 동물의 5/7에서는 도관-수뇨관 접합부 근처에서 일어나고, 계획적인 희생시까지 생존한 1마리의 동물 (군 2의 동물 4, 제 83일)에서는 도관의 앞쪽 말단 (복막 랩 내에서 이식된 시험품이 존재한 곳)에서 일어났다. 도관의 중간 및 뒤쪽 부분은 요로상피 덮개 없이 섬유성 결합 조직 벽으로 구성되었다 (요로상피 및 평활근이 도관의 중간 수준에서 관찰된 군 2의 동물 4에서는 제외). 비뇨기-유사 조직의 재생은, 선택적으로 안락사시킨 동물 5 (군 3, 지방 유래의 SMC)의 수뇨관-도관 접합부 (UCJ)에서의 요로상피, 고유판 및 평활근 다발의 존재와 함께 불과 제28일에 명백하였다. 임플란트의 수뇨관 말단에서의 재생 과정은 구축 임플란트 (군 2 및 3)를 수용하는 동물 사이에서 비교가능한 비뇨기-유사 조직 형성을 초래한다. 구조물 군 (군 2 및 3)에서의 비뇨기-유사 조직 재생의 범위는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다. 계획적인 희생시까지 생존한 1마리의 동물 (군 2의 동물 4, 제 83일)은, 검출된 바이러스 감염에도 불구하고 UCJ, 도관의 앞쪽 및 중간 부분에 존재하는 요로상피 및 평활근을 가지고 있었다. 그러나, 복막-단독 아트리움은 비뇨기-유사 조직 재생을 지지하기에는 불충분했고, 아트리움에서 형성된 조직은 요로상피 점막으로 덮이지 않은 섬유성 결합 조직으로 구성된 벽을 가지고 있었다. 임플란트의 뒤쪽 말단이 복막으로 둘러싸인 내부에서 자유롭게 표류하기 때문에 도관으로부터 아트리움으로의 전이점은 동물에 따라 달랐고, 이는 부검에서 도관으로부터 아트리움으로의 전이를 규정하기 어렵게 하였다. 절편 8 및 12 (뒤쪽 도관으로 추정됨, 도 44)의 전형적인 조성물은 결합된 섬유모세포 및/또는 근섬유모세포를 갖는 콜라겐이었다. 세포 구조물이 없는 복막 도관은 비뇨기-유사 조직 재생을 위해서는 불충분한 것으로 보이나, NUC 임플란트로의 혈관형성의 공급원으로서의 역할을 한다.

[0470] **결론.**

[0471] 비뇨기-유사 조직의 재생은, 수뇨관-도관 접합부에서 요로상피, 고유판 및 평활근 다발의 존재와 함께 불과 제28일에 명백하였다 (동물 5, 지방 유래의 SMC).

[0472] 바이러스 감염 및 동물 모델로부터의 합병증에도 불구하고, 구조물 (혈액 또는 지방으로부터 유래된 SMC로 시딩된 지지체) 이식 (각각 군 2 및 3)은 점막 및 평활근 층으로 구성된 비뇨기-유사 조직 벽을 갖는 도관의 형성을 초래하였다.

[0473] 구조물 군 (군 2 및 3)에서의 비뇨기-유사 조직 재생의 범위는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다. 계획적인 희생시까지 생존하고 PCV-2에 의해 감염된 1마리의 동물 (군 2의 동물 4, 제 83일)은 UCJ, 도관의 앞쪽 및 중간 부분에 존재하는 요로상피 및 평활근을 가지고 있었다.

[0474] 지지체가 혈액 또는 지방으로부터 유래된 SMC로 시딩된 경우(각각 군 2 및 3)에 재생 과정에서 어떠한 식별가능한 차이도 관찰되지 않았다는 것은, 재생을 촉진시키는 데 있어서 SMC 공급원 사이의 등가성을 시사한다.

[0475] 동물 모델 해부학적 구조는 관찰된 합병증을 야기하였다 (즉, 복부 내 시험품의 위치, 아트리움을 형성하기 위한 복막, 복부 내용물에 의한 시험품의 압박 (유착 및 누공의 형성), 및 후속적인 폐쇄를 야기하는 배설물 축적).

[0476] PCV-2 감염이 동물의 3/7에서 확인되었다. 2마리의 PCV-2 감염된 동물은 계획에 없이 부검된 동물이었다. 수술적 이식 부위로 인한 요류의 폐쇄, 및 관강을 압박하는 복부 내용물이 계획에 없는 사망 중 4/6의 원인이 되었다. 1마리의 동물 (군 3의 동물 5)은 조직병리학적 검사를 위해 제28일에 선택적으로 안락사시켰다.

[0477] 실시예 5 - 돼지 모델에서의 이식된 네오-요로관 구조물의 평가

[0478] 이 연구의 목적은 방광, 지방 또는 혈액으로부터 유래된 자가조직 평활근 세포 (SMC)로 시딩된 네오-요로관의 안전성 및 기능성을 평가하는 것이었다. 추가로, 지지체 단독 처리 (SMC로 시딩되지 않음)를 평가하였다.

[0479] **방법:** 네오-요로관 (NUC) 시험품은 자가조직 평활근 세포 (SMC)의 존재 또는 부재 하에 부직 폴리글리콜산 (PGA) 펠트 및 폴리(락트산-코-글리콜산) 중합체 (PLGA)로부터 형성된 지지체로 구성되었다. 달리 나타내지 않는 한, 여기서 따르는 프로토콜은 실시예 3에서 따른 것과 본질적으로 동일하다.

[0480] 연구는 32마리의 괴팅겐 미니돼지 (16마리의 암컷, 16마리의 수컷)로 구성되었고, 이들을 4종의 시험품 중 1종을 수용하도록 할당된 8마리 동물의 4개의 군 (각각의 군마다 4마리의 수컷 및 4마리의 암컷)으로 분할하였다. 방광, 지방 조직, 및 정맥 혈액의 샘플의 생검을 시험품 이식 6 내지 10 주 전에 군 1, 2 및 3 (구조물)의 동물로부터 수득하였다. 군 1, 2 및 3의 동물에 각각 방광, 지방 또는 혈액으로부터 유래된 SMC로 시딩된 시험품을 이식하였다. 군 4의 동물은 생검을 하지 않았고, 지지체 단독 시험품을 이식하였다. 군 1 내지 3의 동물은 2회의 외과적 절차 (생검 + 시험품 이식)를 경험했고, 군 4의 동물은 1회의 외과적 절차 (시험품 이식)를 경험하였다. 시험품을 제 0 일에 모든 동물 (군 1 내지 4)에게, 방광을 제거하고 (근치 방광절제) 시험품의 유입 말단으로 수뇨관을 전환시킴으로써 이식하였다. 시험품을, 중심선을 벗어나 배뇨되는 피부 스토마로부터 검상돌기 근처의 우측 상부 복부 사분면으로, 주위 공기에 직접 노출되지 않도록, 복강의 복부 층에 복강내로 위치시켰다. 혈관 공급원, 수밀성을 제공하고 유출 피부 스토마로 소변 흐름을 돌리기 위해 복막으로 시험품 주위를 둘러쌌다. 복막 랩을 시험품의 뒤쪽 말단 (복강내에 위치함)을 대략 5 내지 7 cm 넘어서 복벽을 통과하여 피부 표면으로 연장시켰다 (본 보고에서 "아트리움"으로 지칭되는 구조). 혈액 및 소변 샘플을 지정된 시점에 수집하고, 분석하고, 결과를 기록하였다. 임플란트, 수뇨관 및 신장의 영상화 (형광투시법, 초음파 검사 및/또는 내시경검사)를 연구 동안 지정된 시점에 수행하였다. 또한, 관찰된 임상적 증상에 반응하여 필요에 따라 영상화를 수행하였다.

[0481] 복강을 개방하고, 도관 (구조물 또는 지지체 단독 시험품 이식의 결과)을 시각화하고 동물 시설 계내에서 디지털 사진을 촬영하였다. 도관을 피부 스토마, 신장 및 수뇨관과 함께 일괄적으로 꺼냈다. 수뇨관을 측정하고, 이어서 문합으로부터 3 내지 4 cm 떨어진 횡절개에 의해 도관으로부터 분리하였다. 신장으로부터 피부 스토마까지의 요로, 부위 림프절, 및 크게 관찰된 다른 병변의 대표적인 조직 샘플을 수득하였다. 모든 조직 샘플을 조직학적 처리 및 평가를 위해 10% 중성 완충 포르말린 (NBF) 중에서 24 내지 48시간 동안 정치시켰다. 고정 후, 조직을 일상적으로 마이크로슬라이드로 처리하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E), 및 마손 3색으로 염색하였다. 슬라이드를 현미경으로 평가하였다.

[0482] 결과

[0483] 사망률 : 결정적 외과수술 동안, 동물 30 (군 4)의 수뇨관이 관통되었고, 이에 따라 시험품 이식을 할 수 없게 되었다. 상기 동물을 제 0 일에 안락사시키고 대체하지 않아, 시험품 (구조물 또는 지지체 단독)을 이식받는 동물의 총 숫자는 31로 감소하였고, 군 4의 숫자도 7마리의 동물로 감소하였다. 다른 모든 동물은 성공적으로 시험 장치를 이식받고, 수술로부터 회복되었다. 동물들은 이식후 6 내지 84일 동안 생존하였다. 24마리의 동물은 계획에 없이 사망하였고, 7마리의 동물은 계획적인 희생시까지 생존하였다.

[0484] *구조물 및 지지체 단독 처리군의 안전성과 관련된 소견*: 수술후 임상 관찰은 군들에 걸쳐 유사하였다. 이들 중 가장 흔한 것은 스토마 흐름 차단 (동물의 31/31), 식욕의 상실 (동물의 30/31), 부드러운 분변 (동물의 23/31) 및 체중 손실 (동물의 21/31)이었다. 생존중 임상 관찰 동안, PCV-2 감염과 일치하는 피부 병변이 관찰되었다. 24마리의 예정에 없이 사망한 동물 중 12마리에서 하나 이상의 병변이 발병하였고, 이는 PCV-2 감염과 관련된 돼지 피부염 신장병증 증후군 (PDNS)으로 여겨지는 별개의 병리적 특징과 일치하였다. PCV-2 상태는 상기 장치와 무관한 이환율에 할당가능한 원인으로 간주되므로, PCV-2 동물은 본 결과 섹션에서 논의하지 않을 것이다. 모든 동물에 대한 이용가능한 데이터를 수득하였다 (데이터는 제시되지 않음). 1) 임상적으로-관찰된 자주색

피부 변색; 2) 신장, 피부 또는 폐에 영향을 미치는 미시적 혈관염 또는 혈관염/혈관주위염; 3) 관형 괴사/유체/원주/사구체신염의 신장 소견, 또는 관형 상피 세포의 바이러스성 봉입체; 4) 1, 2 또는 3의 존재 하에 허리 림프절의 림프구 감손 중 어느 하나가 관찰된 경우에, 동물을 PCV-2-감염된 것으로 분류하였다.

[0485] 이러한 기준에 의해, 24마리의 계획에 없이 부검된 동물 중 12마리 (군 1의 동물의 5/8, 군 2의 동물의 4/8, 군 3의 동물의 2/8, 군 4의 동물의 1/7)에서 돼지 PCV-2 감염이 확인되었다. 모든 동물에서 중요한 임상 관찰은 아트리움, 스토마 또는 스텐트의 배설물 축적의 존재 또는 부재 하에 소변의 유출의 간헐적 폐쇄였다. 폐쇄는 복강의 복부 부분에의 시험품의 배치, 위에 놓이는 복부 기관의 중량이 도관 폐쇄, 유착 및 누공 형성, 및 신장 합병증 (예를 들어, 확장, 염증, 및/또는 수뇨관 또는 신장의 감염)을 야기할 수 있는 해부 관계에 의해 촉진된 것으로 보인다.

[0486] 시험품의 수술적 배치는 모든 연구 동물에서 동일했고, 따라서 폐쇄-관련 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘 (즉, 사지동물의 해부학적 구조 또는 스토마에 축적된 배설물 때문에 도관 상에 얹혀 있는 복부 내장)을 가지고 있었다. 폐쇄는 수뇨관증, 수신증, 신우신염, 유착 및 누공 형성으로 구성되는 중요한 안전성 소견을 야기한다. 수뇨관증과 수신증은 소변 유출의 간헐적 완전 폐쇄로 연결되었다. 신우신염은 잔해 및 배설물 축적, 및 분변 및 피부로부터의 스토마의 박테리아 오염에 부차적인 것으로 간주되었고, 지지체 단독 군 (군 4)에서 가장 보편적이었다. 군 1 내지 3의 동물에 대한 시험품의 수술적 배치 및 여러번의 수술 (생검 및 시험품 이식)은 복부 및 골반 유착의 형성을 촉진하였다. 괴사조직제거 프로토콜 (안정시킨 동물에서 포셉의 사용), 요류 폐쇄, 바이러스 감염 및 장관의 도관에의 유착은 장관-도관 누공 형성의 원인이 되었다.

[0487] *재생과 관련된 소견*: 시험품의 수술적 이식 후에 발달되는 도관은 수뇨관 (앞쪽 말단)으로부터 임플란트 및 아트리움을 지나 복부의 피부에 있는 스토마의 개구부로 진행되는 중심 관강으로 구성되었다. 도관 벽의 조직학적 외관은 도관 내 샘플의 위치 및 동물 생존 시간에 따라 달랐다. 섬유 혈관성 기질을 갖는 점막, 점막하층 및 평활근을 특징으로 하는 비뇨기-유사 조직 재생은, SMC 공급원 (즉, 방광, 지방 또는 혈액)에 관계없이 구조물 (군 1 내지 3) 시험품 이식 후에 관찰되었다. 아래에 놓인 평활근을 갖는 연속적 요로상피로 구성된 요로 조직의 영역이, 구조물 시험품을 이식받은 동물 중 대부분에서 관찰되었다. 대조적으로, 수복성 과정이 지지체 단독 시험품의 이식에 이어 관찰되었고, 이는 한정된 평활근을 갖는 섬유혈관성 기질에 의해 지지되는 비정상 점막을 특징으로 하였다. 구조물 군에서의 비뇨기-유사 조직 재생의 범위는 이식후의 동물 생존 기간에 의해 영향을 받았다.

[0488] **결론:** 31마리 중 7마리 (23%)의 동물이 본 연구를 완수하였다. PCV-2 바이러스 감염, 및 수술적 이식 부위로 인한 요류의 부분적 내지 완전한 비뇨기 폐쇄, 및 관강을 압박하는 복부 내용물이 23/24의 계획에 없는 사망의 원인이 되었다. 생존중 수술적 절차-관련 합병증이 1/24의 계획에 없는 사망의 원인이 되었다. 도관의 간헐적 폐쇄와 관련된 안전성 소견으로는 수신증, 수뇨관증, 신우신염, 유착 및 누공이 있었다.

[0489] 구조물 시험품 중 어느 하나로부터 유래된 도관 부분에서 치유 및 재생이 관찰된 반면에 지지체 단독 시험품으로부터 유래된 도관에서는 치유 및 수복이 관찰되었고, 이는 구조물 이식이 점막 및 평활근 층으로 구성된 천연 비뇨기-유사 조직 벽을 갖는 도관의 형성을 초래하였음을 입증한다.

[0490] 치유에 있어서 구조물 시험품 (재생) 및 지지체 단독 시험품 (수복) 사이의 차이는 중요한 신장 소견이 지지체 단독 시험품에 의해 더 높은 빈도로 관찰되는 원인이 되었고, 이는 지지체 단독 시험품이 추가 개발을 위해 부적합하다는 결정으로 이어졌다.

[0491] 구조물 시험품 사이의 재생 과정 및 결과에서 관찰되는 차이가 전혀 없었다는 것은, 재생 촉진에 있어서 SMC 공급원 사이의 등가성을 시사한다.

[0492] 본 연구의 목적은 방광, 지방 또는 혈액으로부터 유래된 자가조직 평활근 세포 (SMC)로 시딩된 네오-요로관 (NUC)의 안전성 및 기능성을 결정하는 것이었다. 추가로, 지지체 단독 처리 (SMC로 시딩되지 않음)를 평가하였다. 목표는 방광의 수술적 제거 (방광전절제술) 및 시험품의 유입 말단에의 수뇨관 재이식 후에 비뇨기-유사 조직 점막 및 벽으로 구성된 관형 도관 구조를 재생하는 것이었다. 본 연구의 생존중 시기는 약 5 개월 동안 지속되었다.

[0493] 실험 설계.

[0494] **개관.** 32마리의 괴팅겐 미니돼지를 4개 군 (4/성별/군)으로 나누었다. 구조물의 생성에 필요한 SMC를 단리, 특성화 및 증대시키기 위해 시험품 (구조물) 이식 6-10 주 전에 군 1 내지 3의 동물에 대해 외과적 생검 절차를 실시하였다. 제0일에 구조물 또는 지지체 단독 시험품 (군 1-4)을 외과적으로 이식하였다. 방광의 외과적 제

거 (근치적 방광적출술) 후, 수뇨관을 시험품의 유입 말단으로 우회시켰다. 시험품을 복강의 배쪽 바닥부에 위치시키고, 정중선 이탈 부위에서부터 검상 돌기 근처의 우측 상복부 사분면까지 비어 있는 피부 스토마로부터 외기에 직접 노출되지 않도록 하면서 복부 내부에 유지시켰다. 혈관 공급, 수밀성을 제공하고, 소변을 유출 피부 스토마로 보내도록 시험품 주위의 복막을 랩핑하였다. 또한, 복막 랩을 (복강 내부에 위치한) 시험품의 뒤쪽 말단으로부터 복벽을 통해 피부 표면에 이르는 소변 유출 채널 (본 보고서에서 "아트리움"으로 지칭되는 구조)에 이르도록 연장시켰다. 시험품은 부직 폴리글리콜산 (PGA) 펠트 및 폴리(락트산-코-글리콜산) 중합체 (PLGA)로부터 형성된 튜브-형상의 지지체였으며, 자가 SMC (구조물)가 시딩되어 있거나 또는 SMC 부재의 것(지지체 단독)이었다. 군 1의 동물에는 방광-유래 자가 SMC이 시딩된 구조물을 이식하고, 군 2의 동물에는 지방-유래 자가 SMC가 시딩된 구조물을 이식하고, 군 3의 동물에는 혈액-유래 자가 SMC가 시딩된 구조물을 이식하고, 및 군 4의 동물에는 지지체 단독을 이식하였다. 표 5.1은 본 연구 설계의 요약을 제공한다.

[0495] [표 5.1]

[0496]

| 군 번호 | 처리 | 동물의 수 M | 동물의 수 F | 생검 절차 (약 70일전 내지 약 40일전) | 외과적 절차 (제0일) | 수술후 절차 | 예정된 부검 시점 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 자가 방광 SMC | 4 | 4 | 방광 제거 및 지방 생검, 채혈 | 방광적출술, 이어서 네오-요로관 이식과 함께 수뇨관을 앞쪽 말단으로 전위시킴. 전체 시험품을 복막 내에 랩핑시키고, 복막을 시험품의 말단으로부터 피부를 통해 전이시켜, 요실금 스토마를 생성시킴. | 필요에 따라 형광투시경 및 초음파 검사, 전반적인 건강 상태 평가 및 임상 치료, 임상 병리학 및 소변검사 | 84 ± 5일 |
| 2 | 자가 지방 SMC | 4 | 4 | | | | |
| 3 | 자가 혈액 SMC | 4 | 4 | | | | |
| 4 | 지지체 단독 (세포 부재) | 4 | 4 | | | | |

[0497] 표 5.2는 본 연구의 개관을 제공한다(TA=시험품 NA=해당 없음 M=수컷 F=암컷 N=무 Y=유; a - 사망한 상태로 발견된 동물, b - 마취 하에 사망한 동물, c - 수술시 수뇨관 천공 발생; 동물이 교체되지 않음, d-연구에서 이용되지 않은 예비용 동물).

[0498] [표 5.2]

| | 성별 | 군 | 세포 공급원 | 세포 시딩 밀도 (x10$_6$) | 수집된 지방 조직 (g) | 이식일 (제0일)/ 생검 후 일수 | 스텐트 제거 (일) | 이식 후 생존 일수/ 부검 일자 | 계획되지 않은 사망 (Y/N) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | F | 1 | 방광 | 40.7 | 33.0 | 67 | 11 | 81 | N |
| 2 | F | | | 35.7 | 35.0 | 66 | 12 | 68 | Y |
| 3 | F | | | 29 | 33.0 | 64 | 11 | 69 | Y |
| 4 | F | | | 29 | 32.0 | 63 | 14 | 28 | Y |
| 5 | M | | | 24.9 | 5.0 | 63 | 14 | 44 | Y |
| 6 | M | | | 29 | 7.0 | 48 | 13 | 83 | N |
| 7 | M | | | 29 | 18.0 | 49 | 12 | 42 | Y |
| 8 | M | | | 29 | 13.0 | 51 | NA | 9 | Y |
| 9 | F | 2 | 지방 | 33.1 | 29.0 | 60 | 5 | 33 | Y |
| 10 | F | | | 29 | 26.0 | 68 | 8 | 30 | Y |
| 11 | F | | | 29.0 | 30.0 | 58 | 7 | 58 | Y |
| 12 | F | | | 40 | 35.0 | 73 | 5 | 70 | Y |
| 13[a] | M | | | 29 | 7.0 | 57 | 7 | 82 | Y |
| 14 | M | | | 29 | 9.0 | 55 | 8 | 63 | Y |
| 15 | M | | | 29 | 11.0 | 57 | 6 | 81 | N |
| 16[a] | M | | | 24 | 13.0 | 56 | 6 | 63 | Y |
| 17 | F | 3 | 혈액 | 29 | 35.0 | 59 | 6 | 48 | Y |
| 18 | F | | | 24.25 | 25.0 | 57 | 5 | 80 | N |
| 19 | F | | | 29 | 30.0 | 57 | 7 | 70 | Y |
| 20 | F | | | 40.7 | 40.0 | 58 | 5 | 6 | Y |
| 21 | M | | | 29 | 10.0 | 41 | 8 | 73 | Y |
| 22[b] | M | | | 29 | 0.0 | 56 | 7 | 51 | Y |
| 23 | M | | | 29 | 0.0 | 57 | 6 | 81 | N |
| 24 | M | | | 29 | 11.0 | 42 | 8 | 77 | Y |
| 25 | F | 4 | 지지체 단독; 자가 세포 부재 | NA | NA | 0 | 9 | 84 | N |
| 26 | F | | | NA | NA | 0 | 9 | 84 | N |
| 27 | F | | | NA | NA | 0 | 9 | 20 | Y |
| 28[a] | F | | | NA | NA | 0 | 7 | 17 | Y |
| 29 | M | | | NA | NA | 0 | 7 | 48 | Y |
| 30[c] | M | | | NA | NA | NA | NA | NA | Y |
| 31 | M | | | NA | NA | 0 | 6 | 55 | Y |
| 32 | M | | | NA | NA | 0 | 6 | 31 | Y |
| 33[d] | F | 예비용 | NA | NA | 26.0 | NA | NA | NA | 예비용 |
| 34[d] | M | | | NA | 0.0 | NA | NA | NA | 예비용 |

[0499]

[0500] 표기된 시점에서 혈액 및 소변 샘플을 수집하여, 분석 및 기록하였다.

[0501] 연구 동안의 표기된 시점에서 임플란트, 수뇨관, 및 신장에 대한 영상화 (형광투시법, 초음파검사, 및/또는 내시경법)를 실시하였다. 또한 관찰된 임상 증상에 대하여 필요에 따라 영상화를 실시하였다. 동물은 이식후 6 내지 84일 생존하였다. 부검시, 복강을 개방하여, 도관을 가시화하고, 사진 촬영 후, 도관을 신장 및 수뇨관과 함께 일괄적으로 적출하였다. 수뇨관의 길이 및 폭을 측정한 후, 문합으로부터 3-4 cm 떨어진 곳에서의 횡단 절편화에 의해 도관으로부터 분리시켰다. 신장, 수뇨관, 림프절 및 과하게 관찰된 임의의 다른 병변의 대표적인 절편을 수득하였다. 조직학적 프로세싱 및 평가를 위해 모든 조직 샘플을 24 내지 48시간 동안 10% 중성 완충 포르말린 (NBF) 중에 두었다. 고정후, 조직을 일상적으로 처리하여 마이크로슬라이드에 두고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 및 마손 3색으로 염색하였다. 슬라이드에 대해서 전문 병리학자에게 평가를 받았다.

[0502] 이에 대한 병리학 보고는 하기 실시예에 나타나 있다.

[0503] 물질 및 방법.

[0504] 시험 장치

[0505] 시험품은 i) 자가 방광-유래 돼지 평활근 세포 (24.9 x $10^6$개 세포, 40.7 x $10^6$개 세포, 29 x $10^6$개 세포, 24.25 x $10^6$개 세포, 또는 35.7 x $10^6$개 세포)로 시딩된 합성 락티드/글리콜라이드 중합체를 포함하는 도관 형상의 지지체; ii) 자가 혈액-유래 돼지 평활근 세포 (40.7 x $10^6$개 세포 또는 29 x $10^6$개 세포)로 시딩된 합성 락

티드/글리콜라이드 중합체를 포함하는 도관 형상의 지지체 iii) 자가 지방-유래 돼지 평활근 세포 (24 x $10^6$개 세포, 40 x $10^6$개 세포, 33.1 x $10^6$개 세포, 또는 29 x $10^6$개 세포)로 시딩된 합성 락티드/글리콜라이드 중합체를 포함하는 도관 형상의 지지체, 및 iii) 어떠한 세포도 시딩되지 않은 합성 락티드/글리콜라이드 중합체를 포함하는 도관 형상의 지지체였다.

[0506] 2008년 5월 13일에 마샬 팜즈 (Marshall Farms) (뉴욕 노스 로즈 소재)로부터 32마리의 괴팅겐 미니돼지 (암컷 16마리 및 수컷 16마리)를 수령하였다. 동물들은 7개월령이었다. 상기 판매 회사로부터 추가 3마리의 미니돼지 (암컷 2마리 및 수컷 1마리)를 수령하였다. 이들 추가 동물들은 6개월령이었으며, 여분의 동물로서 취득하게 되었다. 수령시, 질환 또는 손상의 징후가 있는지에 대해 동물들을 검사하였다. 최초 검사 후, 최초 운송된 동물들을 수령일로부터 6일 동안 격리시켰으며, 물리적 검사 후에 연구에 사용하기 위해 방출시켰다. 여분의 동물들은 4일 동안 격리되었으나, 이 연구에 사용되지 않았다.

[0507] 최초 군 배정은 평균 군 체중에 기초하여 실시하였다. 군 1-3의 동물들에 있어서, 수거된 조직 및 말초 혈액으로부터의 생체외 세포 증대를 기초로 배정 변화가 이루어졌다.

[0508] 외과적 절차.

[0509] 생검/조직 수집: 군 1-3의 동물 (구조물 시험품)에 있어서, 제0일 (이식 절차) 6-10 주 전에 방광 및 지방 조직, 이뿐 아니라 정맥 혈액에 대한 생검을 수득하였다. 군 4의 동물 (지지체-단독 시험품)은 이러한 절차를 거치지 않았다. 조직 생검 절차에 있어서, 꼬리 바로 옆에서부터 배꼽까지 복부에서 정중선 절개가 이루어졌다. 가능한 경우 이 정중선 접근 지점으로부터 대략 20-50 g의 부드럽고 유연한 피하 지방 조직 (결합 조직 부재함)의 지방 생검을 수집하였다. 방광의 정단 돔으로부터 방광 생검 (대략 2.5 cm x 2.5 cm)을 수집하였다. 수집된 조직 샘플을 개별적으로 및 무균적으로 조직 배양 배지가 담긴 용기로 옮겼다. 그런 다음 흡수가능한 봉합 물질을 이용하여 2개 이상의 층에서 방광에서의 결함 부위를 봉합하였다. 복부 절개 부위를 적절한 크기의 흡수가능한 봉합 물질로 결대로 봉합하였다. 다시 적절한 크기의 흡수가능한 봉합 물질을 이용하여 피부를 피하봉합 방식으로 봉합하였다.

[0510] 헤파린 처리된 진공채혈관에 동물 당 대략 6개의 10-ml 정맥 혈액 분취액을 수집하였다. 그 후, 이 혈액 바이알들을 아이스팩으로 냉각시킨 용기 (약 8℃) 내에 포장하였다.

[0511] **시험 장치 이식.** 배꼽에 대해 5 cm 앞쪽으로 정중선 복부 절개를 실시하고, 뒤쪽으로 대략 15 cm 연장시켰다. 복막을 확인한 후, 조심스럽게 복부 공간으로부터 분리시켰다. 조직이 무손상 상태로 남아 혈관화가 일어나도록 주의하여 돌보았다.

[0512] 그런 다음, 방광을 노출시키고, 조심스럽게 소변을 배출하여, 복강 내로 들어가는 소변이 없도록 하였다. 방광에 영양분을 공급하는 동맥 및 정맥을 확인한 후 결찰하였다. 수뇨관을 확인하고, 스텐트를 삽입한 후, 방광으로부터 조심스럽게 절개해 내었다. 요도를 절개된 대로 휘갑치기로 봉합하였다. 그런 다음 방광을 적출하였다. 좌측 수뇨관을 조심스럽게 그를 둘러싼 복막뒤 근막으로부터 분리하되 (앞쪽으로 연장시킴), 시험품의 우측면에 이르기에 충분한 유동성이 있을 때까지 하였다. 우측 수뇨관을 자유로이 해부하되, 시험품의 유입 (앞쪽) 말단에 이를 때까지 하였다. 수뇨관을 3-0 바이크릴을 이용하여 단순한 연속 패턴으로 시험품 상으로 봉합하였다. 혈관 공급, 수밀성을 제공하고, 소변을 유출 피부 스토마로 보내도록 시험품 주위로 복막을 랩핑하였다. 또한, 복막 랩을 (복강 내에 위치한) 시험품의 뒤쪽 말단으로부터 대략 5-7 cm 연장시켜, 복벽을 통해서 피부 표면에 이르는 소변 유출 채널을 형성시켰다. 복막을 3-0 바이크릴로 봉합하였다.

[0513] **스토마 및 스토마 포트 절차.** 유선 옆쪽에 있는 복부의 복벽 상에 스토마를 생성시켰다. 구조물 또는 지지체-단독 부재의 복막 아트리움을 외부로 꺼내어 피부에 대해 봉합하였다. 외과적 접착제를 봉합선을 따라 도포하였으며, 거기에서 복막은 체벽 외부에 있었다. 스텐트에 연결된 봉합 가닥들을 이후의 제거를 위해 스토마를 통해 외부로 꺼냈다. 스토마 포트 (트라코에(TRACOE)(등록상표))를 위치시켰다. 이식 후 대략 1-3개월 후에, 남아있는 동물에 대해 연구용의 스토마 포트를 사용하였다. 두 종류 모두, 스토마 포트가 고정된 후, 흡수가능하지 않은 프로렌 봉합을 이용하여 복부 절개를 봉합하였다. 통상의 방식으로 피부를 봉합하였다.

[0514] 스텐트 제거. 이식 수술 후 5 내지 14일로부터의 다양한 시점에서 동물들을 상기 기재한 바와 같이 마취시킨 후, 수뇨관 스텐트를 제거하였다.

[0515] 수술후 관리.

[0516] **스토마 포트.** 이식 후 2주 동안, 스토마 포트를 개통성 (소변 배출)에 관해 매일 평가하였다. 검사시 소변이 떨어지고 있는 것으로 관찰되지 않았다면, 스토마 포트에 염수를 흘려주어 개통성을 평가하였다.

[0517] **절개 부위.** 또한, 절개 부위에 대해서도 이식 후 2주 동안 (또는 치유될 때까지) 열개, 비정상적 분비물, 냄새, 자극 또는 임의의 이상이 있는지 매일 평가하였다.

[0518] **괴사조직절제술:** 배설/건락성 물질이 도관에 축적되어 소변의 자유로운 흐름을 방해할 잠재성이 있기 때문에 괴사조직절제술을 개시하였다. 연구 대상 동물은 이식후 35 내지 52일에 이르렀다. 괴사조직절제술을 위해, 동물들에 기재된 바와 같이 진정제를 투여하였다. 배설 물질이 스토마 개구부보다 큰 경우, 괴사조직절제술을 용이하게 하기 위해 스토마 상에 소규모 절개를 실시하였다. 배설물은 가시적으로 확인되었으며, 겸자로 집어 부드럽게 잡아당겼다. 가시적인 배설물을 모두 제거한 후, 스토마에 염수 용액을 흘려주었다. 스토마 절개부를 봉합에 의해 폐쇄하고, 새로운 연구용 스토마 포트를 삽입하고, 봉합하여 동물에 고정시켰다. 프로토콜마다 동물들에 회복할 시간을 허용하였다.

[0519] **경정맥 포트.** 제4주가 될 때까지 매주 및 각각의 이후의 사용시 개통성의 확보를 위해 경정맥 포트 카테터에 주사가능한 염수를 흘려준 후 헤파린 (100 U/mL, 약 2-3mL)으로 막아두었다.

[0520] 영상화

[0521] 정맥신우조영술. 제8주 동안 및 부검 전에, 형광투시경의 도움 하에 신장 동맥 내로 직접 방사선 불투과성 조영제를 주사한 후 신우조영상을 수득하였다. 이 절차를 위해 동물들에 진정제를 투여한 후, 대퇴 동맥 또는 말초 정맥 중 하나를 통해 접근하였다.

[0522] **루포그래피(Loopography) (역행성 신우조영술).** 동물 5마리 [군 2 동물 9 (제33일) 및 10 (제30일); 군 3 동물 17 (제48일) 및 군 4 동물 27 (제20일) 및 29 (제41일)]에 대해 루포그래피를 실시하여 누관의 존재를 확인하였다. 이들 동물들의 스토마 복부 영역을 세척, 헹굼 및 건조하여 형광투시경 영상화에 대해 준비시켰다. 염수: 조영 매질의 3:1 혼합물을 스토마를 통해 도관 내로 주사하였다. 그런 다음, 형광투시경 영상화를 실시하였다.

[0523] 초음파검사. 제2주, 제6주, 및 제10주 동안, 및 부검 전에 도관 및 신장에 대해 초음파 영상화를 기저시점 (신장 단독)에서 실시하였다. 이 절차를 위해 동물들을 마취시켰다.

[0524] 관찰.

[0525] **체중.** 생검 (군 1-3) 전, 이식술 (군 1-4) 전, 및 부검 (군 1-4) 전에 체중을 기록하였다.

[0526] 임상 병리학.

[0527] 혈액. 제1주, 제2주, 제3주, 제4주 및 제8주에 생검 (군 1-3) 전 및 이식술 (군 4) 전에, 및 부검 전에 경정맥 (군 1-4) 내의 유치 포트를 통해 혈액학(CBC), 응고, 및 혈청 화학 매개변수에 대한 분석을 위한 혈액 샘플을 수집하였다. 혈액 가스의 분석을 위한 혈액 샘플은 경정맥 또는 대퇴 정맥 중 하나를 통해 생검 전 (군 1-3) 및 이식술 전 (군 4)에 수집하였다.

[0528] 혈액학, 응고, 혈청 화학, 및 혈액 가스에 대한 분석은 실시예 3에 기재된 바와 같이 실시하였다.

[0529] 추가 분석. 안락사 직전에, 동물 23, 18, 12, 6, 1, 및 15로부터 헤파린 처리된 혈액 및 혈청 샘플을 수집하였다. 1개의 전혈 10-mL 샘플은 헤파린 튜브 내로 수집하였다. 추가 혈액은 2개의 4.0-mL 혈청 분리 튜브 내로 수집하고, 혈청을 상기 기재한 바와 같이 분리하였다.

[0530] **소변.** 계획된 시점에서 (생검 전 [군 1-3], 이식술 전 [군 4] 및 부검 전) 카테터 삽입 또는 시험관 채취 방법의 2가지 방법을 사용하여 소변 샘플을 수집하였다. 사용된 방법을 기록하였다. 원하는 샘플 크기는 3 ml 이상이었으며, 이는 멸균 5-ml 튜브 중 3개의 분취액으로 분리하기 위함이었다. 샘플 수집이 곤란하게 된 경우, 정량적 샘플을 먼저 수집하였다. 샘플에 대해 실시예 3에 기재된 바와 같이 정성적 및 정량적 매개변수를 평가하였다.

[0531] 결과.

[0532] **생검.** 군 1, 2, 3의 모든 동물 및 예비용 동물에서 프로토콜에 따라 방광 조직 및 혈액 샘플을 수득하였다. 모든 수컷 동물로부터의 지방 조직 생검은 프로토콜에서 규정된 최소치인 20 g 미만이었다. 그러나, 군 2에 배정된 수컷에 있어서 수집된 조직으로부터 SMC를 충분히 증대시켜 구조물을 생성하였다. 3마리 동물 (동물 22

및 23, 및 예비용 동물 34)로부터는 지방 조직을 수득할 수 없었다. 동물 22 및 23는 군 3에 배정되었다. 지방 생검 샘플의 개별 중량은 표 5.2에 제시되어 있다.

[0533] **이식.** 2가지 예외를 제외하고는 모든 동물에 대해 무사히 이식이 이루어졌다. 동물 30 (수컷, 군 4)은 해부학적으로 작은 수뇨관을 가져, 시험품 이식시 스텐트를 위치시키고자 했을 때 천공이 일어났다. 이 동물을 안락사시키고, 교체하지 않았다. 동물 29 (수컷, 군 4)도 또한 시험품 이식시 작은 수뇨관으로 인한 천공이 발생했다. 이 동물은 성공적으로 이식되었고, 외과적 절차시 생존하였다.

[0534] **스텐트 제거.** 개별 스텐트 제거 데이터는 표 5.2에 제시되어 있다. 이식 후 5 내지 14일에 수뇨관 스텐트를 제거하였다.

[0535] 사망률. 시험품이 이식된 31마리 동물 각각의 이식 후 생존 일수 및 최종 처분이 표 5.2 (상기) 및 표 5.5 (하기)에 나타나 있다. 동물 30 (군 4)는 수뇨관 천공으로 인해 시험품이 이식되지 않았다. 이 동물은 안락사되었으며, 교체되지 않아서, 동물의 총 수는 31로, 및 군 4의 동물 수는 7마리로 감소하였다. 24마리의 동물은 계획되지 않은 사망에 이르렀고, 7마리의 동물은 계획적인 희생시까지 생존하였다. 상기 24마리의 계획되지 않은 사망의 성격 (사망 분류)은 표 5.3에서 처리군에 따라 요약되어 있다.

[0536] [표 5.3]

[0537]

| 사망률 | 군 1 | 군 2 | 군 3 | 군 4 | 합계 |
|---|---|---|---|---|---|
| N 군 | 8 | 8 | 8 | 7 | 31 |
| 생애 절차 관련 사망 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 | 1/31 |
| 사망한 채로 발견됨 | 0/8 | 2/8 | 0/8 | 1/7 | 3/31 |
| 안락사 | 6/8 | 5/8 | 5/8 | 4/7 | 20/31 |
| 총 계획되지 않은 부검 | 6/8 | 7/8 | 6/8 | 5/7 | 24/31 |
| 계획된 부검 | 2/8 | 1/8 | 2/8 | 2/7 | 7/31 |

[0538] PCV-2 연관 사망률. 생존중 임상 관찰 동안, PCV-2 감염과 일치하는 피부 병변을 관찰하였다. PCV-2 상태는 장치와 관련되지 않은 이환의 지정가능한 원인으로 간주되기 때문에, PCV-2 동물은 결과 부분에서 논의되지 않을 것이다.

[0539] **비-PCV-2 연관 사망률.** 총 12마리의 계획되지 않은 사망은 검출된 PCV-2 바이러스 감염과 연관되지 않았다 (1마리의 생존중 절차 관련 사망을 포함함). PCV-2 감염에 기인하지 않는 12마리의 계획되지 않은 사망은 군 1 중 1마리의 동물 (동물 8)의 1마리의 동물, 군 2 중 3마리의 동물 (동물 11, 9 및 12), 군 3 중 4마리의 동물 (동물 24, 21, 22 및 17) 및 군 4의 4마리의 동물 (동물 32, 31, 29 및 27)을 포함하였다. 이들 동물의 임상 감소에서 중요한 사건은 스토마를 통한 소변 및 배설물의 배출의 폐쇄였다. 폐쇄는 위에 놓인 복부 기관의 중량이 도관 폐쇄, 유착 및 누관 형성, 및 신장 합병증 (예를 들면, 확장, 염증 및/또는 수뇨관 또는 신장의 감염)을 초래할 수 있는 복강의 복부측 부분에서의 시험품의 배치에 의해 촉진되었다. 시험품의 수술적 배치는 모든 연구 동물에서 동일하였으며, 이에 따라 폐쇄 관련 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘이었다 (즉, 복부 내장이 사지 동물 해부로 인해 도관 상에 놓임).

[0540] **근저의 소견에 의한 계획되지 않은 사망의 분포.** 24마리의 계획되지 않은 사망에서의 근저의 소견의 개요를 하기 표 5.4에 나타내었다.

[0541] [표 5.4]

[0542]

| 사망률 항목 | 군 1 | 군 2 | 군 3 | 군 4 | 합계 |
|---|---|---|---|---|---|
| PCV-2 감염의 증거 | 5 | 4 | 2 | 1 | 12 |
| 비-PCV-2 연관 계획되지 않은 사망 | 1 | 3 | 4 | 4 | 12 |
| 총 계획되지 않은 사망 | 6 | 7 | 6 | 5 | 24 |

[0543] 시험품이 이식된 각각의 동물에 대한 사망률 항목을 하기 표 5.5에 나타내었다 (S = 계획적인 희생; FD = 사망한 채로 발견됨; E = 불량한 임상 상태로 인한 안락사; A = 회복 절차상의 합병증 중간 연구 동안 사망; SMC = 평활근 세포; NA = 해당 없음; F = 암컷; M = 수컷; P = PCV-2 연관 사망률; 비-P = 비-PCV-2 연관 사망률; SURV = 계획적인 희생까지 생존)

[0544] [표 5.5]

| 동물 | 성별 | 군 | SMC 공급원 | 연구 일수 | 특성 | 사망률 군 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | M | 1 | 방광 | 44 | E | P |
| 2 | F | | | 68 | E | P |
| 8 | M | | | 9 | E | 비-P |
| 4 | F | | | 28 | E | P |
| 1 | F | | | 81 | S | SURV |
| 3 | F | | | 69 | E | P |
| 6 | M | | | 83 | S | SURV |
| 7 | M | | | 42 | E | P |
| 13 | M | 2 | 지방 | 82 | FD | P |
| 16 | M | | | 63 | FD | P |
| 10 | F | | | 30 | E | P |
| 9 | F | | | 33 | E | 비-P |
| 11 | F | | | 58 | E | 비-P |
| 14 | M | | | 63 | E | P |
| 12 | F | | | 70 | E | 비-P |
| 15 | M | | | 81 | S | SURV |
| 18 | F | 3 | 혈액 | 80 | S | SURV |
| 24 | M | | | 77 | E | 비-P |
| 21 | M | | | 73 | E | 비-P |
| 20 | F | | | 6 | E | P |
| 22 | M | | | 51 | A | 비-P |
| 23 | M | | | 81 | S | SURV |
| 19 | F | | | 70 | E | P |
| 17 | F | | | 48 | E | 비-P |
| 26 | F | 4 | 지지체 단독, SMC 없음 | 84 | S | SURV |
| 32 | M | | | 31 | E | 비-P |
| 27 | F | | | 20 | E | 비-P |
| 31 | M | | | 55 | E | 비-P |
| 25 | F | | | 84 | S | SURV |
| 29 | M | | | 48 | E | 비-P |
| 28 | F | | | 17 | FD | P |

[0545]

[0546] 안전성에 대한 적절한 소견. 시험품이 이식된 모든 31마리의 동물에 대해 개별 및 군 데이터를 수득하였다 (하기에 나타내지 않았음). 논의는 계획된 부검까지 생존한 7마리의 동물 및 12마리의 비-PCV-2 연관 계획되지 않은 사망에 초점을 둔다. 데이터는 다음과 같이 조직화되었다.

[0547] 7마리의 생존한 동물에 대한 임상 건강 관찰 및 수술후 치유. 이식후 처음 30일 동안, 모든 동물에 대해 괴사조직제거를 수행하지 않았다. 모든 7마리의 동물에서, 식욕부진 (섭취하지 않음)이 관찰되었으며, 스토마 포트 보수가 수행되었다. 묽은 대변 (설사)이 군 1의 2/2 (동물 1) 및 군 3 중 1/2 (동물 23)인 7마리 중 3마리의 동물에서 관찰되었다. 이들 관찰은 외과 수술 절차에서 드문 결과는 아니다 (표 5.6 - 7마리의 생존한 동물의 군에 의한 적절한 임상 건강 관찰 및 수술후 치유(<30일 PI)).

[0548] [표 5.6]

| 임상 관찰 | 군 1 N=2 | 군 2 N=1 | 군 3 N=2 | 군 4 N=2 | 합계 N=7 |
|---|---|---|---|---|---|
| 괴사조직제거 | 0/2 | 0/1 | 0/2 | 0/2 | 0/7 |
| 식욕부진 (먹지 않음) | 2/2 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | 7/7 |
| 스토마 포트 보수 | 2/2 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 7/7 |
| 연질 분변(설사) | 2/2 | 0/1 | 1/2 | 0/2 | 3/7 |

[0549]

[0550] 제30일 후 (즉, 제31일 내지 제84일±5일/부검), 군 1 중 1/2 (동물 1), 군 2 중 1/1 (동물 15) 및 군 3 중 2/2 (동물 23)인 7마리의 동물 중 4마리의 동물에서 괴사조직제거를 수행하여, 잔해/배설물을 제거하였다. 지지체 단독이 이식된 동물 (군 4)은 괴사조직제거 절차를 수행하지 않았다. 식욕부진 (먹지 않음)은 군 1 중 1/2 (동물 1), 군 2 중 1/1 (동물 15), 군 3 중 1/2 (동물 18) 및 군 4 중 1/2 (동물 26)인 7마리 중 4마리의 동물에서 관찰되었다. 스토마 포트 보수는 모든 7마리의 동물에서 수행되었다. 연질 분변 (설사)은 군 1 중 2/2 (동물 1 및 6), 군 2 중 1/1 (동물 15) 및 군 3 중 2/2 (동물 23 및 18)인 7마리 중 5마리의 동물에서 관찰되었다 (하기 표 5.7 - 7마리의 생존한 동물의 군에 의한 적절한 임상 건강 관찰 및 수술후 치유; (>30일 PI)를 참조하기 바람).

[0551] [표 5.7]

| 임상 관찰 | 군 1 N=2 | 군 2 N=1 | 군 3 N=2 | 군 4 N=2 | 합계 N=7 |
|---|---|---|---|---|---|
| 괴사조직제거 | 1/2 | 1/1 | 2/2 | 0/2 | 4/7 |
| 식욕부진 (먹지 않음) | 1/2 | 1/1 | 1/2 | 1/2 | 4/7 |
| 스토마 포트 보수 | 2/2 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 7/7 |
| 연질 분변(설사) | 2/2 | 1/1 | 2/2 | 0/2 | 5/7 |

[0552]

[0553] 12마리의 비-PCV-2 **계획되지 않은 사망**에 대한 임상 건강 관찰 및 수술후 치유. 이식후 처음 30일 동안, 괴사조직제거는 모든 동물에 대해 수행하지 않았다. 식욕부진 (먹지 않음)은 군 1 중 1/1 (동물 번호 8), 군 2 중 3/3 (동물 번호 9, 11 및 12), 군 3 중 4/4 (동물 번호 17, 21, 24 및 22) 및 군 4 중 3/4 (동물 번호 27, 32 및 29)인 12마리 중 11마리의 동물에서 관찰되었다. 스토마 포트 보수는 모든 12마리의 동물에서 수행되었다. 연질 분변 (설사)은 12마리 중 5마리의 동물(군 1 중 1/1 (동물 번호 8), 군 2 중 1/3 (동물 번호 11) 및 군 3 중 3/4 (동물 번호 21, 22 및 24))에서 관찰되었다. 이들 관찰은 외과 수술 절차에서 드문 결과는 아니다 (하기 표 5.8 참조).

[0554] [표 5.8]

| 임상 관찰 | 군 1 N=1 | 군 2 N=3 | 군 3 N=4 | 군 4 N=4 | 합계 N=12 |
|---|---|---|---|---|---|
| 괴사조직제거 | 0/1 | 0/3 | 0/4 | 0/4 | 0/12 |
| 식욕부진 (먹지 않음) | 1/1 | 3/3 | 4/4 | 3/4 | 11/12 |
| 스토마 포트 보수 | 1/1 | 3/3 | 4/4 | 4/4 | 12/12 |
| 연질 분변(설사) | 1/1 | 1/3 | 3/4 | 0/4 | 5/12 |

[0555]

[0556] 2마리의 동물을 제30일 전에 안락사시켰다(군 1 동물 번호 8 (제9일) 및 군 4 동물 번호 27 (제20일)). 각각 군 4 동물 번호 32 및 군 2 동물 번호 9인 2마리의 동물을 제31일 및 제33일에 안락사시켰다. 이들 동물은 30일 초과 분석에 포함되었다. 제30일 후 (즉, 제31일 내지 제84일±5일/부검), 군 2 중 2/3 (동물 번호 12 및 11) 및 군 3 중 3/4 (동물 번호 21, 22 및 24)인 12마리 중 5마리의 동물에서 괴사조직제거를 수행하여, 잔해/배설물을 제거하였다. 지지체 단독이 이식된 동물 (군 4)은 괴사조직제거 절차의 임플란트 전에 안락사되거나 사망이 발견되었다. 식욕부진 (먹지 않음)은 군 2 중 1/3 (동물 번호 11), 군 3 중 4/4 (동물 번호 17, 21, 22 및 24) 및 군 4 중 2/4 동물 (동물 번호 29 및 31)인 12마리 중 7마리의 동물에서 관찰되었다. 스토마 포트 보수는 군 2 중 3/3 (동물 번호 9, 11 및 12), 군 3 중 4/4 (동물 번호 21, 22, 17 및 24) 및 군 4 중 3/4 (동물 번호 29, 31 및 32)인 10/12 동물에서 수행되었다. 연질 분변 (설사)은 군 2 중 3/3 (동물 번호 9, 11 및 12), 군 3 중 4/4 (동물 번호 17, 21, 22 및 24) 및 군 4 중 1/4 (동물 번호 29)인 12마리 중 8마리의 동물에서 관찰되었다. 부정적인 건강 관찰은 폐색 의 결과인 것으로 여겨진다 (표 5.9 - 12마리의 비-PCV-2 계획되지 않은 사망군에 의한 적절한 임상 건강 관찰 및 수술후 치유 (>30일 PI)).

[0557] [표 5.9]

| 임상적 관찰 | 군 1 N=1 | 군 2 N=3 | 군 3 N=4 | 군 4 N=4 | 합계 N=12 |
|---|---|---|---|---|---|
| 괴사조직제거 | 0/1* | 2/3^ | 3/4 | 0/4◆▲ | 5/12 |
| 식욕부진 (먹지 않음) | 0/1* | 1/3^ | 4/4 | 2/4◆▲ | 7/12 |
| 스토마 포트 보수 | 0/1* | 3/3^ | 3/4 | 3/4◆▲ | 9/12 |
| 연질 분변(설사) | 0/1* | 3/3^ | 4/4 | 1/4◆▲ | 8/12 |

* 동물 8은 제9일에 안락사시켰음.

◆ 동물 27은 제20일에 안락사시켰음.

▲ 동물 32은 제31일에 안락사시켰음.

^ 동물 27 은 제 33 일에 안락사시켰음.

[0558]

[0559] **7마리의 생존한 동물에 대한 체중**. 모든 7마리의 동물의 체중은 수술후 합병증 (예를 들면, 폐색, 복부 유착, 누관 및 신장 합병증을 초래하는 동물 모델 합병증)으로 인해 연구 동안 변동하였다 (표 5.12). 각각의 군의 동물의 마릿수는 작았지만, 모든 동물 수용 구조물 (군 1 내지 3)은 생검전으로부터 수술전까지 중량이 증가하였다. 군 3을 제외한 모든 군은 이식 시점으로부터 부검까지 중량이 감소하였다.

[0560] [표 5.12]

| 군 | 체중 (Kg)—평균* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 생검전 | 수술전 | Δ: 생검전 → 수술전 | % Δ 생검전 → 수술전 | 부검전 | Δ:수술전→ 부검전 | % Δ 수술전→ 부검전 |
| 1 (N=2) | 14.0 | 17.9 | 3.9 | 30% | 14.8 | -3.1 | -15% |
| 2 (N=1) | 15.4 | 17.1 | 1.7 | 11% | 15.7 | -1.4 | -8% |
| 3 (N=2) | 13.2 | 16.7 | 3.5 | 27% | 19.4 | 2.7 | 16% |
| 4 (N=2) | NA | 15.3 | NA | NA | 14.1 | -1.2 | -9% |

[0561]

[0562] 12마리의 비-PCV-2 계획되지 않은 사망에 대한 체중. 모든 12마리의 동물의 체중은 수술후 합병증 (예를 들면, 폐색, 복부 유착, 누관 및 신장 합병증을 초래하는 동물 모델 합병증)으로 인해 연구 동안 변동하였다 (표 5.13). 모든 동물 수용 구조물 (군 1 내지 3)은 생검전으로부터 수술후까지 중량이 증가하였다. 모든 군은 이식 시점으로부터 부검까지 중량이 감소하였으며, 군 1 (N=1)의 중량이 가장 크게 감소하고, 군 2의 중량이 가장 적게 감소하였다 (표 5.13 - 12마리의 비-PCV-2 계획되지 않은 사망에 대한 군별 평균 체중; NA= 해당 없음).

[0563] [표 5.13]

| 군 | 체중 (Kg)—평균* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 생검전 | 수술전 | Δ: 생검전 → 수술전 | % Δ 생검전 → 수술전 | 부검전 | Δ: 수술전 → 부검전 | % Δ 수술전→ 부검전 |
| 1 (N=1) | 14.2 | 16.0 | 1.8 | 13% | 11.5 | -4.5 | -28% |
| 2 (N=3) | 14.9 | 18.9 | 4.1 | 30% | 17.5 | -1.4 | -8% |
| 3 (N=4) | 14.5 | 17.4 | 2.9 | 20% | 15.0 | -2.4 | -14.2 % |
| 4 (N=4) | NA | 16.4 | NA | NA | 13.6 | -2.7 | -17% |

[0564]

[0565] 임상 병리학. 개별 동물에 대한 임상 병리학 데이터 (혈액 (CBC); 응고; 혈청 화학; 혈액 가스; 및 검뇨)를 수득하였다.

[0566] 데이터에 나타난 바와 같이 모든 군에 대하여 증가 및 감소가 관찰되었다. 일반적으로, 구축 임플란트 수용 동물(군 1 내지 군 3)에 대한 프로파일은 크기가 유사하고 일시적으로 교차하나; 지지체-단독 군(군 4)은 보다 진전되고 심각한 신장 악화를 시사하는 보다 큰 크기의 보다 이른 혈청 변화를 갖는 것으로 나타났다.

[0567] 데이터에서 모든 군에 대하여 증가 및 감소가 관찰되었다. 일반적으로, 구축 임플란트 수용 동물(군 1 내지 군 3)에 대한 프로파일은 크기가 유사하고 일시적으로 교차하나; 지지체-단독 군(군 4)은 보다 진전되고 심각한 신장 악화를 시사하는 보다 큰 크기의 보다 이른 혈청 변화를 갖는 것으로 나타났다.

[0568] 7마리의 생존 동물 및 12마리의 비-PCV-2의 계획되지 않은 사망에 대한 혈액 가스 데이터. 모든 혈액 가스 데이터는 19마리 동물 모두에 대해서 정상 범위 내였다.

[0569] 7마리의 생존 동물 및 12마리의 비-PCV-2의 계획되지 않은 사망에 대한 검뇨. 7마리의 생존 동물에 대한 계획적인 부검시, 지지체 단독 군(군 4)이 부검에서 가장 높은 값을 나타내었지만, 평균 요 단백질 값은 모든 군에 대해서 0 내지 100 mg/dL의 정상 범위 내였다 (표 5.87). 12마리의 비-PCV-2의 계획되지 않은 사망에 대한 부검에서 얻어진 데이터가 불충분하였기 때문에, 비교가 이루어지지 않았다. 표 5.87은 7마리 생존 동물의 군에 의한 평균 요 단백질을 제공한다.

[0570] [표 5.87]

| 군 | 기저시점 | 부검전 |
|---|---|---|
| 1 (N=2) | 22 | 23 |
| 2 (N=1) | 15 | 12 |
| 3 (N=2) | 19 | 47 |
| 4 (N=2) | 2 | 83 |

[0571]

[0572] 영상화. 정맥내 신우조영사진(IVP) 및 루포그램(역행성 신우조영사진)은 각각의 동물에 대하여 수행되었다. 수뇨관 및 신장 중 하나 또는 둘 다의 IV 신우조영사진 시각화는 일치하지 않았다. 일부 경우에는 신장, 수뇨관 및 도관이 가시성(방사선 불투과성)인 반면, 다른 경우에는 가시도가 매우 제한되거나 없었다. 연구의 특성으로 인하여, 시각화가 제한되는 희석 대조 용액이 사용되었다.

[0573] 7마리의 생존 동물에 대한 IVP. 6/7 동물 (번호 1, 6, 15, 23, 25 및 26)에서, 제8주 신우조영사진이 가능하였다. 제8주에, 동물 번호 18(군 3)에 대한 신우조영사진은 (부주의에 의해) 얻지 못하였다. 그러나, 이 편차의 영향은 단 하나의 분실된 동물 번호 18(군 3)에 대한 신우조영사진으로 제한된다. 7/7 동물 모두에 대하여 안락사전에 신우조영사진이 행해졌다.

[0574] 대표적인 신우조영사진 영상이 제공되어 있다. 도 49는 군 1의 동물 6에 대한 제8주 (a) 및 부검전 (b)에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다. 도 50은 군 2의 동물 15에 대한 제8주 (a) 및 부검전 (b)에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다. 도 51은 군 2의 동물 9에 대한 제5주에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다 (루포그램: 장 조명은 누관을 표시함). 도 52는 군 3의 동물 17에 대한 제7주에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다 (루포그램: 장 조명은 누관을 표시함). 도 53은 군 3의 동물 21에 대한 제8주에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다 (신장 둘다; 각각 수뇨관 및 도관이 조명됨). 도 54는 군 2의 동물 24에 대한 제8주에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다 (하나의 신장 및 수뇨관 가시성임). 도 55는 군 2의 동물 23에 대한 제8주 (a) 및 스토마 포트가 있는 도관의 부검전 (b)에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다. 도 56은 군 4의 동물 25에 대한 제8주 (a) 및 부검전 (b)에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다. 도 57은 군 4의 동물 26에 대한 제8주 (a) 및 부검전 (b)에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다. 도 58은 군 4의 동물 29에 대한 제4주 - 수뇨관 가시성 (a) 및 제4주 루포그램 - 장 누관 (b)에서의 신우조영사진 영상을 나타낸다.

[0575] **12마리의 비-PCV-2의 계획되지 않은 사망에 대한 IVP.** 이들 동물은 명시된 신우조영사진까지 생존하지 못했다. 좋지 못한 건강, 도관/장 누관의 존재 및 이른 안락사로 인하여, 몇몇이 부검전 신우조영사진을 수행하지 못했다.

[0576] 7마리의 생존 동물에 대한 루포그램(역행성 신우조영사진) 대표적인 루포그램은 상기와 같이 나타났다. 7마리의 생존 동물 중 1마리의 동물을 장-도관 누관 형성에 대하여 평가하였다. 루포그램은 3주 동안 동물 번호 25에 대하여 수행하였다. 도관은 누관이 없는 것으로 확인되었다. 동물은 회복되었고 계속 연구하여 성공적으로 완료하였다.

[0577] 12마리의 비-PCV-2의 계획되지 않은 사망에 대한 루포그램(역행성 신우조영사진) 12마리의 비-PCV-2의 계획되지 않은 사망 동물 중 4마리에 대하여 장-도관 누관이 연구의 생전 상태 동안 확인되었다: 루포그램(역행성 신우조영사진)은 다양한 시점에서 수행되어 군 2의 동물 번호 9(제33일); 군 3의 동물 번호 17(제48일) 및 군 4의 동물 번호 27(제20일) 및 29(제41일)에서 누관의 존재를 확인하였다. 이들 동물은 이식후 20일 내지 48일에 안락사시키고 부검하였다.

[0578] **7마리의 생존 동물에 대한 초음파** 개별 및 군의 초음파 검사를 나타낸다. 연구 동안 신장에 대한 초음파 검사는 모든 처리군에서 신장의 변화(수신증)를 나타내는 표면적(길이 x 폭)의 증가가 나타났다. 군의 평균은 모든 군의 우측 및 좌측 신장에 대하여 시간에 걸쳐 유사하였다.

[0579] 임플란트에 대한 초음파 검사는 모든 구조물 군(군 1 내지 군 3)에서 시간에 걸쳐 벽 두께의 감소를 나타내었다. 지지체 단독 군(군 4)은 두께가 약간 증가한 것으로 나타났다 (표 5.89 - 7마리의 생존 동물에 대

한 군에 의한 평균 도관 벽 두께(cm)).

[0580] [표 5.89]

[0581]

| 군 | 제2주 | 제6주 | 제10주 | 부검전 |
|---|---|---|---|---|
| 1 (N=2) | 0.327 | 0.227 | 0.152 | 0.181 |
| 2 (N=1) | 0.172 | 0.169 | 0.099 | 0.114 |
| 3 (N=2) | 0.333 | 0.239 | 0.169 | 0.145 |
| 4 (N=2) | 0.196 | 0.248 | 0.179 | 0.222 |

[0582] 연구 동안의 신장에 대한 초음파검사는 모든 치료 군에서의 신장 변화 (수신증)를 나타내는 표면적 (길이×너비)의 증가를 나타내었다. 군 평균은 우측 및 좌측 신장에 대하여 모든 군에서 시간에 따라 유사하였다.

[0583] 임플란트에 대한 초음파검사는 모든 구조물 군 (군 1-3)에서 시간에 따라 벽 두께의 감소를 나타내었다. 지지체-단독 군 (군 4)은 두께에서 약간의 증가를 나타내었으나, 분석을 위한 데이터 지점이 제한되어 있다 (표 5.93 - 12마리의 비-PCV-2 계획되지 않은 사망에 대하여 군에 대한 평균 도관 벽 두께 (cm)).

[0584] [표 5.93]

[0585]

| 군 | 제2주 | 제6주 | 제10주 | 부검전 |
|---|---|---|---|---|
| 1 (N=1)* | NA | NA | NA | NA |
| 2 (N=3) | 0.225 | 0.201 | 0.157 | 0.131 |
| 3 (N=4) | 0.291 | 0.184 | 0.228 | 0.144 |
| 4 (N=4) | 0.203 | 0.358 | NA | NA |

[0586] NA = 적용 불가

[0587] 동물 번호 8은 9일째에 안락사시켰다.

[0588] 병리 증상. 병리 증상 보고서를 하기 실시예에 나타낸다.

[0589] 폐쇄 결과로부터의 바이러스 감염 및 계획되지 않은 사망은 연구 기간 동안 생존하는 동물의 수를 32마리에서 총 7마리로 감소시켰다. 희생시까지 생존한 동물 (N = 7)에 대하여, 유착은 모든 동물에 존재하였으며, 장-도관 누관은 7마리 동물 중 4마리에 존재하였다 (하기 병리 증상 실시예). 수뇨관증 및 수신증 (일측성 또는 양측성)은 모든 동물에 존재하였으며, 신우신염은 7마리 동물 중 1마리에 존재하였다. 신우신염을 갖는 동물은 지지체-단독 치료 군 (군 4) 중에 있었다. 비-PCV-2 계획되지 않은 사망 (N = 12)에 대하여, 유착은 모든 동물에 존재하였으며, 누관은 12마리 동물 중 7마리 (장-도관) 및 12마리 동물 중 1마리 (수뇨관-장)에 존재하였다. 수뇨관증 및 수신증 (일측성 또는 양측성)은 12마리 동물 중 8마리에 존재하였으며, 신우신염은 12마리 동물 중 4마리에 존재하였다. 신우신염을 갖는 3마리 동물은 지지체-단독 치료 군 (군 4) 중에 있었으며, 1마리 동물은 혈액-유래 자가 SMC 치료 군 (군 3) 중에 있었다. 계획되지 않은 사망을 유발하는 합병증에도 불구하고, 구축 임플란트는 요로상피 및 평활근 층으로 구성된 조직이 생성되는 재생 과정에 대한 템플릿(template)으로서 기능하였다. 재생은 임플란트의 수뇨관 말단에서 가장 현저하였다. 도관의 뒤쪽 임플란트 및 아트리움 단편에서의 조직은 요로상피 내층이 없는 섬유성 결합 조직으로 구성된 벽을 가졌다. 임플란트의 수뇨관 말단에서의 재생 과정은 구조물 군 사이에서 유사한 비뇨기 조직 형성을 유발하였으며, 이는 지지체-단독 군의 상징인 수복성 회복과는 구별된다.

[0590] 지지체-단독 시험품은 추가의 발생에 적합하지 않은 것으로 측정되었는데, 결과가 정상 비뇨기 조직에 부합하지 않았으며, 이들 동물은 보다 높은 양측성 신장 합병증 발병률을 가졌기 때문이다. 세포 공급원과는 무관하게, 구조물 군에서 관찰되는 결과는 동등하였다.

[0591] 논의. 수술로부터 회복된 31마리 동물 중, 7마리 동물 (23%; 각각의 군 1, 3 및 4에서 2마리; 및 군 2에서 1마리)은 연구 중의 생존 중인 부분의 전체 기간을 성공적으로 이행하였다. 육안으로 보이는 병리 증상이 모든

군에서 명백하였으며, 이에는 바이러스 감염, 요류의 간헐성 폐쇄, 도관에서의 잔해 및 배설물 축적, 복부 및 골반 유착, 누관, 수신증, 및 수뇨관증 및 신우신염의 증거가 포함된다. 비뇨기 조직 재생의 증거가 각각의 공급원으로부터의 SMC와 함께 시딩된 구축 임플란트에서 다양한 수준으로 관찰되었다 (군 1-3, 각각 방광, 지방 및 혈액 유도된 SMC). 그러나, 불완전한 비뇨기 조직 회복 및 상부 요로 병리 증상의 증가된 발병률이 지지체-단독 이식된 동물 (군 4)에서 관찰되었다. 31마리 동물 중 12마리 (39%)가 PCV-2 바이러스에 감염되었다. 비록 바이러스 감염이 생존 감소를 유발하였지만, 비뇨기 조직 재생은 구조물 군 (군 1-3)에서도 관찰되었다. 시험품의 수술 배치를 동물 후생 목적으로 설계하여 4지 동물에 의한 최적 배뇨를 달성하여, 요로부터의 자극성 접촉성 피부염 및 잠재적인 조기 이환상태 및 안락사를 피하도록 하였다. 그러나, 이러한 수술 방법은 시험품이 위에 놓인 복부 기관 바로 아래에 있게 되도록 하였으며, 이러한 기관의 중량 및 복부 내장의 압력이 간헐성 도관 폐쇄를 유발하였다. 이러한 4지 동물 특이적 수술 배치는 관찰된 유착, 누관, 및 상부 요로 합병증 (예를 들면, 수뇨관 또는 신장의 확장, 염증 및/또는 감염)의 원인이 될 수도 있다. 그러나, 장 폐쇄는 상기 연구에서 관찰되지 않았다. 수술후 유착의 발생 및 예방의 연구를 위한 동물 모델로서 돼지가 흔히 사용되며, 따라서 일부 유착 발생이 단지 구조물 동물 (군 1-3)에서의 생검 수집을 위한 복부 개복술로부터 예상되었다. 또한, 군 1-3에서의 동물은 시험품을 이식하기 위한 제2 수술 절차를 겪어, 단일 수술 절차 (시험품 이식 단독)를 겪는 지지체-단독 임플란트를 받는 동물과 비교하여 유착의 위험이 실질적으로 증가하였다. 상기 연구에서 관찰되는 유착은 이러한 수술 절차의 결과로서 고려되었다.

[0592] 상부 요로에서 주목되는 모든 유해한 조사 결과 (수뇨관증, 수신증 및 신우신염)는 도관을 통한 요의 흐름이 간헐적으로 폐쇄되는 상태의 결과였다. 이 연구에서의 4지 동물 돼지에서 관찰되는 신우신염은 잔해 및 배설물 축적, 및 분변 및 피부로부터의 스토마의 박테리아 오염에 속발성인 것으로 여겨졌다. 신우신염은 지지체-단독 동물 (군 4)에서 가장 빈번하게 관찰되었다. 모든 동물에 대한 시험품의 수술 배치, 및 군 1-3에서의 동물에 대한 복합 수술 (생검 및 시험품 이식)은 복부 및 골반 유착의 형성을 촉진하였다. 게다가, 간헐성 폐쇄, 스토마 관리를 위해 사용되는 괴사조직제거술 프로토콜 (배설물 축적을 제거하기 위해 진정된 동물에서의 겸자의 사용), 바이러스 감염, 및 장관과 도관과의 유착은 장-도관 누관 형성 및 상부 신장 질환에 기여하였다. 계획되지 않은 사망을 유발하는 합병증에도 불구하고, 구축 임플란트 (군 1-3)는 요로상피 및 평활근 층 (천연 비뇨기 조직 성분)으로 구성된 조직을 생성하는 재생 과정에 대한 템플릿으로서 기능하였다. 재생은 임플란트의 수뇨관 말단에서 가장 현저하였다. 도관의 아트리움 (구조물 또는 지지체가 없는 복막 조직 단독) 단편에서의 조직은 요로상피 내층이 없는 섬유성 결합 조직으로 구성된 벽을 가져, 복막 단독은 비뇨기 조직의 재생을 보조할 수 없다는 것을 나타낸다. 임플란트의 수뇨관 말단에서의 재생 과정은 구조물 군 사이에서 유사한 비뇨기 조직 형성을 유발하였으며, 이는 지지체-단독 군의 상징인 수복성 회복과는 구별된다. 지지체-단독 시험품 결과는 정상 비뇨기 조직과 부합하지 않았으며, 상기 벽은 관내강의 반흔형성 및/또는 협착증에 걸리기 쉬운 섬유혈관 결합 조직으로 구성되어 있었다. 지지체-단독 임플란트를 받는 동물에서의 비뇨기 조직의 불완전한 형성은 상기 논의된 간헐성 폐쇄로부터의 상부 요로 조사 결과를 악화시키며, 군 4 동물은 보다 높은 양측성 신장 합병증 발병률을 가졌다. 세포 공급원과는 무관하게, 구조물 군에서 관찰되는 결과는 동등하였다.

[0593] 결론. 이 연구의 목적은 자가 방광-유래, 지방-유래 또는 혈액-유래 평활근 세포 (SMC), 또는 지지체-단독 (SMC 부재의 지지체)과 함께 시딩된 네오-요로관 (NUC)의 안정성 및 기능성을 평가하기 위한 것이었다. 기능성 평가는 요류 및 비뇨기 조직 재생이었다. 31마리 동물 중 오직 7마리 (23%)만이 상기 연구를 완료하였다. 31마리의 계획되지 않은 사망 중 24마리를 기초로 한 1급 안정성 조사 결과는 상부 요로 손상 (수신증, 수뇨관증 및 신우신염)을 유발하는 PCV-2 바이러스 감염 및 도관의 간헐성 폐쇄였다. 폐쇄는 스토마의 괴사조직제거술 및 염수 플러싱에 의해 관리되었다. 섬유혈관 스토마를 갖는 점막, 점막하 및 평활근을 특징으로 하는 비뇨기 조직-유사 재생은 SMC 공급원 (즉, 방광, 지방 또는 혈액)과는 무관하게 구조물 시험품 이식 후 관찰되었다. 대조적으로, 제한된 평활근을 갖는 섬유혈관 스토마에 의해 지지되는 비정상적 점막을 특징으로 하는 지지체-단독 시험품의 이식 후에 수복 과정이 관찰되었다. 모든 구조물 군에서의 조직 생검 및 시험품 이식과 관련된 2개 수술 절차, 및 유착 형성에 대한 돼지의 소인은 재생된 조직 및 위에 놓인 장 사이의 유착을 유발하였다. 누관 형성은 빈번한 스토마 세척 및 돼지의 4지 동물 자세에 의해 악화되었다. 지지체-단독 시험품에서의 SMC의 부재는 비뇨기 조직의 불완전한 발생 및 폐쇄 후의 사망률의 증가에 기여하는 것으로 나타나, 지지체-단독 시험품이 추가의 발생에 적합하지 않다는 결정을 유발하였다.

[0594] 실시예 6 - 네오-요로관 구조물의 이식 후의 동물의 병리 증상

[0595] 실시예 5에서 기재된 연구의 결과로, 시험 동물의 해부학적 병리 증상을 평가하였다.

[0596] 조직 수집. 프로토콜에 따라서, 복강을 개방하고, 도관 (구조물 또는 지지체-단독 시험품의 이식의 결과)을 동

물 실험실에서 시각화하고 디지털 촬영하였다. 도관을 신장 및 수뇨관과 함께 일괄적으로 제거하였다. 수뇨관을 측정하고, 이후 문합으로부터 3 내지 4 cm 떨어져 횡방향 절개하여 도관으로부터 분리하였다. 육안으로 관찰되는 신장, 수뇨관, 림프절 및 임의의 다른 병변의 대표적인 절편을 수득하였다. 모든 조직 샘플은 조직학적 프로세싱 및 평가를 위해 10% 중성 완충 포르말린 (NBF)에 두었다.

[0597] 조직학적 프로세싱. 고정 후, 도관을 종방향 (유출과 평행)으로 개방하고, 하기 트리밍 다이어그램에서 예시된 것과 같이 등쪽 절반과 배쪽 절반으로 나누었다.

[0598] 도 59a 및 59b는 DB-252 동물 번호 18로부터의 고정후 도관 조직 및 트리밍 개략도를 나타낸다. 도 59c는 수뇨관, 스토마, 중간-도관 및 게실의 위치를 나타낸다.

[0599] 3개 횡방향 절편을 각각의 절반의 주요부로부터 트리밍하였다 (각각, 등쪽 절반 상의 슬라이드 5, 6, 7, 및 배쪽 절반 상의 슬라이드 9, 10, 11에 포획된 앞쪽, 중간 및 뒤쪽). 각각의 절반으로부터의 한 절편을 아트리움으로부터 취하였다 (등쪽 절반 상의 슬라이드 8, 및 배쪽 절반 상의 슬라이드 12에 포획됨). 추가의 절편을 각각의 두 수뇨관-도관 접합부 (슬라이드 13에 포획된 좌측, 슬라이드 15에 포획된 우측)에서 취하였다. 한 다른 슬라이드 (번호 17)를 사용하여 피부 표면 및 복벽을 따라 인접한 관에서 스토마를 포획하였다. 도관의 크기가 허용되는 경우에, 상기 도식은 11개 슬라이드를 생성하였다. 일부 도관은 트리밍 도식을 수용하기에는 길이가 너무 짧으므로, 이용가능한 도관을 보다 작은 절편으로 나누었다. 각각의 동물로부터 수집된 절편에는 도관 등쪽 앞쪽, 도관 등쪽 중간, 도관 등쪽 뒤쪽, 등쪽 스토마 도관 접합부, 도관 배쪽 앞쪽, 도관 배쪽 중간, 배쪽 도관 스토마 접합부, 좌측 수뇨관-도관 스토마 접합부, 우측 수뇨관-도관 접합부, 및 도관 스토마-피부 접합부가 포함된다. 추가적으로, 하기 조직/장기 절편을 조직학용으로 수득하고 제출하였다: 좌측 신장 (슬라이드 1), 우측 신장 (슬라이드 2), 좌측 수뇨관 (슬라이드 14), 우측 수뇨관 (슬라이드 16), 허리 림프절 (슬라이드 3), 장간막 림프절 (슬라이드 4) 및 임의의 육안 병변 (슬라이드 18, 19 등). 조직의 트리밍 동안에, 예시 목적을 위해 디지털 촬영하였다. 고정 후, 조직을 통상적인 절차에 따라 마이크로슬라이드에 처리하고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 및 마손 3색으로 염색하였다. 슬라이드를 현미경으로 평가하였다. 적절한 경우에, 개별 동물 데이터에 대한 현미경 관측값을 얻고, 스코어링하였다.

[0600] 결과

[0601] 사망률. 완결수술 동안에, 동물 번호 30 (군 4)의 수뇨관을 천공하여, 이에 따라 시험품 이식을 방해하였다. 동물을 안락사시키며 대체하지 않아, 시험품 (구조물 또는 지지체-단독)이 이식된 총 N마리의 동물이 31마리로 줄어들었으며, 군 4의 N마리의 동물이 7마리로 줄어들었다. 24마리의 동물이 계획되지 않은 사망되었으며, 계획적인 희생시까지 7마리 동물이 생존하였다.

[0602] 하기 단락은 계획되지 않은 사망에 대해 관찰된 근원적인 조사 결과를 논의한다.

[0603] 바이러스성 관련된 사망률. 생존 동안의 임상적 관찰 동안에, PCV-2 감염에 부합하는 피부 병변이 관찰되었다. 12마리의 계획되지 않은 사망 동물은 PCV-2 감염과 관련된 돼지 피부염 및 신증 증후군 (PDNS)에서 비롯된 독특한 병리학적 특징에 부합하는 하나 이상의 병변이 발생하였다.

[0604] 24마리의 계획되지 않은 부검 동물 중 12마리에서 돼지 PCV-2 감염이 확인되었다. 이에는 군 1에서의 5마리 동물 (동물 번호 5113342, 7, 2, 4 및 3); 군 2에서의 4마리 동물 (동물 번호 13, 16, 14 및 10); 군 3에서의 2마리 동물 (동물 번호 20 및 19); 및 군 4에서의 1마리 동물 (동물 번호 28)이 포함되었다. PCV-2 동물로부터의 현미경 조사 결과는 결과 단락에서 논의되지는 않을 것인데, PCV-2 병태는 장치와 무관하게 이환상태의 이상원인으로 간주되었기 때문이다.

[0605] 비-PCV-2 관련된 사망률. 총 12마리의 계획되지 않은 사망은 검출된 PCV-2 바이러스 감염 (하나의 생존 동안의 절차-관련된 사망 포함)과 관련되지는 않았다. PCV-2 감염에 따르지 않는 12마리의 계획되지 않은 사망에는 군 1에서의 1마리 동물 (동물 번호 8); 군 2에서의 3마리 동물 (동물 번호 11, 9 및 12); 군 3에서의 4마리 동물 (동물 번호 24, 21, 22 및 17); 및 군 4에서의 4마리 동물 (동물 번호 32, 31, 29 및 27)이 포함되었다. 이들 동물의 임상적 악화에서의 중요한 사건은 스토마를 통한 요 및 잔해의 유출의 폐쇄였다. 폐쇄는 위에 놓인 복부 기관의 무게가 도관 폐쇄, 유착 및 누관 형성, 및 신장 합병증 (예를 들면, 수뇨관 또는 신장의 확장, 염증 및/또는 감염)을 유발할 수 있는 경우에 복강의 배쪽 부분에의 시험품의 배치에 의해 촉진되는 것으로 나타났다. 시험품의 수술 배치는 모든 연구 동물에서 동일하였으며; 따라서, 폐쇄-관련된 합병증은 모든 군에서 유사한 병리생물학적 메카니즘 (즉, 4지 동물 해부로 인한 도관에 존재하는 복부 내장)을 가졌다.

[0606] 안정성과 관련된 조사 결과. 모든 동물에 대한 육안으로 보이는 조사 결과 및 현미경 상관관계의 포괄적인 항

목을 수집하였다 (데이터는 나타내지 않음). 개개의 현미경 동물 데이터를 수집하였다 (데이터는 나타내지 않음). 육안으로 보이는 조사 결과 및 현미경 조사 결과의 논의는 계획적인 희생시까지 생존하는 7마리 동물 및 12마리의 비-PCV-2 관련된 계획되지 않은 사망 (N = 19)에서의 시험품의 해부적 배치에 의해 촉진되는 요 유출의 폐쇄와 관련하여 촛점을 맞추었다. 시험품의 이식으로부터 형성된 도관을 다양하게 사이징하고 복부의 복막 뒤 공간에 위치되는 튜브를 조형하였다. 수뇨관을 도관의 앞쪽 말단에 넣었다 (수뇨관-도관 접합부, UCJ, 도 59). 요류는 복막 래핑된 임플란트 및 아트리움으로 향하게 하였으며, 스토마에서 나타났다. 종종, 도관의 앞쪽 말단은, 게실로도 지칭되는 양측성 망울 확장을 가졌으며, 이는 간헐성 폐쇄의 결과로 여겨졌다.

[0607] 유착 및 누관. 도관의 배쪽면을 복벽의 근막 및 골격근에 유착시켰으며, 등쪽면을 복막으로 덮었다. 부검 시에, 도관은 종종 시각화하기 어려웠는데, 현저한 유착 때문이다 (예를 들면, 위장관, 장막, 자궁, 정낭, 간, 췌장, 비장 또는 생식기에의 도관의 유착). 도관의 관내강은 종종 배설물로 채워진다. 도관 및 인접한 중공 기관 (예를 들면, 장) 사이에의 누관이 관찰되었다. 구체적으로, 도관-장 또는 도관-수뇨관 누관이 19마리의 평가된 동물에서 관찰되었다.

[0608] 7마리의 생존 동물에서의 유착 및 누관. 유착은 계획적인 희생시까지 생존하는 7마리 동물 모두에 존재하였다. 도관 및 장관 사이에의 누관은 이들 7마리의 동물 중 4마리에서 관찰되었다: 군 1에서 2/2 (동물 번호 1 및 6); 군 2에서 1/1 (동물 번호 15); 및 군 3에서 1/2 (동물 번호 23).

[0609] **12 마리의 비계획 사망에서의 유착 및 누관.** 12 마리의 비-PCV-2 관련 조기 사망에서 모두 유착이 존재하였다 (표 6.5). 도관 및 장관 사이 누관의 존재가 12 마리의 동물 중 7 마리에서 관찰되었다: 군 2에서 3/3 (동물 번호 11, 12 및 9), 군 3에서 3/4 (동물 번호 21, 22 및 17) 및 군 4에서 1/4 (동물 번호 29). 장 및 수뇨관 사이의 누관이 군 4 동물에서 관찰되었다 (동물 번호 27).

[0610] **수뇨관 및 신장.** 거시적으로 관찰된 두꺼워진 수뇨관은 미시적 평가에 의한 몇몇 근원적인 현상으로 인한 것이다. 수뇨관 확장 (또는 수뇨관증)은 정상적인 수뇨관 벽 구조를 갖는 팽창된 내강이 특징이다. 이행 세포 증식증은 이행 상피 중 증가된 수의 세포가 특징이고, 액포 형성은 상피 중 원형의 투명한 액포가 특징이다. 수뇨관 주위 장간막의 아급성/만성 염증은 수뇨관 주변의 장간막이 콜라겐 및 섬유모세포에 의해, 때때로 림프구 및 대식세포에 의해 팽창될 때 발생한다. 이러한 염증은 보통 수뇨관의 근육 피막 또는 요로상피에 영향을 미치지 않는다. 수뇨관 주변 염증은 수뇨관과 장 또는 생식 기관 사이의 유착과 관련이 있을 수 있으나, 이것은 또한 유착 없이 발생할 수도 있다.

[0611] 미시적으로, 수신증은 신장 피질의 축소 (thinning) 및 만성 염증 (섬유증, 림프구, 혈장 세포 및 때때로 대식세포)이 있는 신우의 확장이 특징이다. 수신증은 하부 비뇨기계 (수뇨관, 도관 또는 아트리움/스토마)에서의 전체적인 또는 부분적인 폐색의 결과인 것으로 고려된다. 종종 수신증과 관련된 만성-활성 신우신염은 호중구 및 세포 잔해의 신우로의 침윤, 종종 원위 수질로의 확산이 특징이다.

[0612] 신우신염은 신우로 올라가는 하부 요로의 박테리아 감염의 결과인 것으로 고려된다. (수신증이 없는) 만성 신장염은 신장 피질 또는 수질에서 염증성 세포 (림프구, 대식세포, 혈장 세포 및 때때로 호중구)의 침윤이 있는 섬유증이 특징이다.

[0613] 만성 신장염이 있는 신장의 피질은 수신증/만성 신장염이 있는 동물에서와 유사한 것으로 보이나, 만성 신장염에서, 신우는 확장되지 않는다. 만성-활성 신장염은 외관에서 만성 신장염과 유사하나, 호중구의 유의한 침윤이 있다. 관형 괴저/유체/캐스트 (cast)/사구체신염은 사구체 중 호중구, 림프구 및 대식세포, 개별 관형 상피성 세포의 괴저, 단백질성 관형 캐스트 및/또는 관형 내강 중 출혈이 특징인 배치 변화이다.

[0614] **7 마리의 생존 동물 중 수뇨관증 및 수신증 및/또는 신우신염.** 수뇨관증 및 수신증이 7 마리의 생존 동물 모두에서 미시적으로 관찰되었다 (표 6.6). 일측성 수뇨관증 (2/7 동물): 군 3에서 2 마리의 동물 (동물 번호 23 및 18). 이측성 수뇨관증 (5/7 동물): 군 1에서 2 마리의 동물 (동물 번호 1 및 6), 군 2에서 1 마리의 동물 (동물 번호 15), 및 군 4에서 2 마리의 동물 (동물 번호 25 및 26). 일측성 수신증 (6/7 동물): 군 1에서 2 마리의 동물 (동물 번호 1 및 6), 군 2에서 1 마리의 동물 (동물 번호 15), 군 3에서 2 마리의 동물 (동물 번호 18 및 23), 및 군 4에서 1마리의 동물 (동물 번호 26). 이측성 수신증 (1/7 동물); 군 4 (동물 번호 25). 신우신염 (일측성)이 7 마리의 동물 중 1 마리에서 관찰되었다 (군 4, 동물 번호 26).

[0615] 12 마리의 비계획 사망 중 수뇨관증 및 수신증 및/또는 신우신염. 수뇨관증 및/또는 수신증이 8/12 및 비-PCV-2 관련된 조기 사망의 8/12에서 각각 미시적으로 관찰되었다 (표 6.7). 일측성 수뇨관증 (3/12 동물): 군 2에서 1 마리의 동물 (동물 번호 12), 군 3에서 1 마리의 동물 (동물 번호 21) 및 군 4에서 1 마리의 동물 (동물

번호 27). 이측성 수뇨관증 (5/12 동물): 군 3에서 2 마리의 동물 (동물 번호 22 및 24), 및 군 4에서 3 마리의 동물 (동물 번호 32, 31 및 29). 일측성 수신증 (5/12 동물): 군 2에서 2 마리의 동물 (동물 번호 9 및 12), 군 3에서 1 마리의 동물 (동물 번호 21), 및 군 4에서 2 마리의 동물 (동물 번호 32 및 27). 이측성 수신증 (3/12 동물): 군 3에서 1 마리의 동물 (동물 번호 24) 및 군 4에서 2 마리의 동물 (동물 번호 31 및 29).

[0616] 12 마리의 동물 중 2 마리에서 일측성 신우신염이 관찰되었다: 군 3에서 1 마리의 동물 (동물 번호 24) 및 군 4에서 1 마리의 동물 (동물 번호 32). 12 마리의 동물 중 2 마리에서 이측성 신우신염이 관찰되었다: 군 4에서 2 마리의 동물 (동물 번호 31 및 29).

[0617] **요로관의 재생과 관련된 연구 결과.** 각각의 구획으로부터 조직 성분은 관찰되지 않았다 (데이터는 제시되지 않음). 하기 재생과 관련된 연구 결과에 대한 논의는 생존하여 계획 도살된 7 마리의 동물 및 12 마리의 비계획 사망으로부터의 조직학적 평가 (도 59)로부터 수득된 구획에 집중되었다. 수술로 시험품을 이식한 후 발달된 도관은 임플란트 및 아트리움을 통해 수뇨관 (앞쪽 말단)으로부터 복부의 피부 중 스토마 개구부로 순환되는 중앙 내강으로 구성된다. 도관 벽의 조직학적 외관은 도관 내 샘플의 위치 및 동물 생존 시간에 따라 변화하였다.

[0618] **수뇨관-도관 접합부 및 도관의 앞쪽 부분.** 수뇨관-도관 접합부 (UCJ; 도 59 중 구획 13 및 15) 및 앞쪽 부분 (도 59 중 구획 5 및 9)을 감싸는 도관의 앞쪽 말단 부근 조직의 전형적인 조성물은 산재된 결합 조직이 있는 평활근 섬유의 요로상피 상부층이다. UCJ 및 도관의 앞쪽 구획은 비록 도관 벽 두께는 전형적으로, 특히 게실 내에서 수뇨관의 두께보다 두껍지만 수뇨관과 형태적으로 유사하였다. 게실은 좌측 및 우측 수뇨관-도관 접합부로부터 뒤쪽으로 돌출된 도관의 2-구획 부분으로서 나타났다. 요로상피의 전형적인 외관은 최소한도로 내지 알맞게 액포가 형성되었고, 두께는 다양하였다. 요로상피의 두께는 최소한도로 내지 알맞게 가늘어지고 (특히 대형 게실 내에서), 최소한도로 내지 약간 과형성되었다. 생존하여 계획 도살된 생존한 7 마리의 동물에 대해, 구획 5, 9, 13 및 15에서 관찰된 요로상피 및 평활근 층의 발생은 모든 동물에서 유사하였다.

[0619] [표 6.8]

7 마리의 생존 동물에서 앞쪽 도관 중 요로상피 및 평활근의 발생

| 조직학적 연구 결과 | 군 1 N=1 | 군 2 N=2 | 군 3 N=2 | 군 4 N=2 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | 요로상피의 존재 |
| UCJ (슬라이드 13 또는 15) | 2/2 | 1/1 | 2/2 | 2/2 |
| 앞쪽 도관 (슬라이드 5 또는 9) | 1/2* | 1/1 | 1/2* | 1/2 |
| | | 평활근의 존재 | | |
| UCJ (슬라이드 13 또는 15) | 2/2 | 1/1 | 2/2 | 2/2 |
| 앞쪽 도관 (슬라이드 5 또는 9) | 1/2* | 1/1 | 1/2* | 1/2 |

*재생 도관의 크기로 인해, 군 1 및 군 3 에서 군당 1 마리의 동물에서 구획(들)을 평가하기 위해서 이용가능한 조직이 불충분하였다.

[0620]

[0621] 12 마리의 비-PCV-2 관련 조기 사망에 대해, 구획 5, 9, 13 및 15에서 요로상피 및 평활근 층의 발생은 구축 임플란트를 받은 군 내에서 및 군간 동물들 중에서 유사하였다 (군 1 내지 3). 지지체-단독 임플란트를 받은 동물 (군 4) 중 구획 5, 9, 13 및 15에서 요로상피 및 평활근 층의 발생은 구축 임플란트를 받은 동물에서 관찰된 것보다 적었다.

[0622] [표 6.9]

12 마리의 비계획 사망에 있어서 앞쪽 도관 중 요로상피 및 평활근의 발생

| 조직학적 연구 결과 | 군 1 *N=1 | 군 2 N=3 | 군 3 N=4 | 군 4 N=4 |
|---|---|---|---|---|
| | | | | 요로상피의 존재 |
| UCJ (슬라이드 13 또는 15) | 0/1 | 3/3 | 4/4 | 3/4 |
| 앞쪽 도관 (슬라이드 5 또는 9) | 0/1 | 2/3 | 2/4^ | 0/4 |
| | | 평활근의 존재 | | |
| UCJ (슬라이드 13 또는 15) | 0/1 | 2/3 | 4/4 | 2/4 |
| 앞쪽 도관 (슬라이드 5 또는 9) | 0/1 | 2/3 | 2/4^ | 0/4 |

*연구 9일째 동물

^재생 도관의 크기로 인해, 군 3 중 한 동물에서 구획(들)을 평가하기 위해서 이용가능한 조직이 불충분하였다.

[0623]

[0624] **도관의 중간 및 뒤쪽 부분.** 19 마리의 동물 모두에 대해서, 도관의 중간 (도 59 중 구획 6 및 10) 및 뒤쪽 (도 59 중 구획 7 및 11) 부분의 전형적인 외관은 UCJ 및 앞쪽 구획에서 관찰된 외관과 상이하였다. 임플란트의 뒤쪽 말단이 복막 랩핑 (peritoneal wrapping) 내에서 자유롭게 떠다니기 때문에 도관으로부터 아트리움으로의 전이 지점은 동물들간 다양하였고, 이것은 부검시 도관으로부터 아트리움으로의 전이를 밝히기 어렵게 한다. 구

획 6, 7, 10 및 11의 전형적인 조성물은 관련 섬유모세포가 있는 조직화된 콜라겐이었다. 콜라겐성 벽의 내부에, 내강에 가장 가깝게 더 적은 림프구 및 대식세포가 있는 느슨하게 배열된 콜라겐, 모세혈관 및 풍부한 호중구로 구성된 만성-활성 염증의 층이 있다. 염증의 내부에, 내강은 혼합된 박테리아 콜로니와 함께 종종 퇴화성 또는 괴저성 염증성 세포 (주로 호중구) 및 세포 잔해로 구성된 배설물로 채워진다.

[0625] **도관의 아트리움 및 스토마 부분.** 도관의 아트리움-스토마 말단 영역 (도 59 중 구획 8, 12 및 17)에서, 스토마-아트리움 접합부가 명백하였고, 여기서 스토마 진피의 조직화된 콜라겐 및 부속기는 콜라겐성 벽 (부속기 없이)에 나란히 위치하였다. 19 마리의 동물 모두에 대해, 이러한 구획은 주로 편평 상피 및 만성-활성 염증/배설물로 구성되었다. 전형적으로, 피부의 편평 상피 (표피)는 아트리움에 걸쳐 앞쪽 방향으로 짧은 거리 동안 연장된다. 아트리움의 외부 표면은 복막 기원의 느슨한 결합 조직으로 구성되었다. 이러한 외부 덮개는 장막층의 등가물이고, 신경, 혈관, 지방 조직, 및 섬유성 결합 조직의 일부 영역 (콜라겐 섬유 및 섬유모세포)을 포함한다. 하나의 누관 부위에서, 장소외 장 점막이 누관에 인접한 도관의 소형 절편을 덮는 것으로 관찰되었다. 이것은 7 마리의 생존한 군 2의 동물 중 하나에서 관찰되었다 (동물 번호 15).

[0626] 구축 임플란트 또는 지지체-단독 임플란트를 받은 동물에서의 치유 성과. 섬유혈관 간질이 있는 점막층, 점막하층 및 평활근이 특징인 비뇨기 조직-유사 재생이 SMC 공급원 (즉 방광, 지방 또는 혈액)과 무관하게 구조물 시험품을 이식한 후에 관찰되었다. 기저 평활근이 있는 연속 요로상피로 구성된 방광-유사 조직 영역은 구조물 시험품을 이식한 5 마리의 생존 동물 중 4 마리에서, 그리고 8 마리의 비계획 도살 동물 중 4 마리에서 관찰되었다. 지지체-단독 동물 대부분에서, 도관 조직 형태는 기저 평활근 없이 수뇨관-도관 접합부로부터 단지 짧은 거리 (대략 1 mm)만 연장하는 요로상피가 특징인 회복 과정과 양립할 수 있었다.

[0627] **토의.** 31 마리의 동물 중 생존한 7 마리는 계획 부검하고, 연구 과정 동안 24/31 동물은 비계획 안락사시키거나 또는 사망한 채로 발견되었다. 바이러스 감염으로 12/24 비계획 사망하였다. 이 연구 과정 중 PCV-2의 동시 발생 감염과 양립할 수 있는 임상적 및 병리학적 징후가 모두 있었다. 거시적 연구 결과는 피부의 반상 출혈 (임상적으로, 보라색 변색) 및 확장된 서혜부 림프절이었다 (바이러스 감염의 거시적 연구 결과는 11/24 비계획 사망 중 관찰되었다). 미시적 연구 결과는 관형 괴저/유체/캐스트/사구체신염으로 구성되는 신장 변화, 신장내 관형 상피성 세포 중 호산구성 세포내 함유물, 및 신장 및 수뇨관 중 혈관염/혈관 주변 염증, 및 폐에서의 염증을 포함하였다 (미시적 연구 결과로 부검에서 PCV-2 감염된 추가 동물이 밝혀져 바이러스 감염과 관련된 총 비계획 사망은 12/24이 되었다). 24 마리의 비계획 사망 중 12 마리는 비-PCV-2 관련이었으며, 1/24 비계획 사망은 생존 중 시술 후 합병증의 결과이었고, 11/24 비계획 사망은 폐색의 결과이었다. 돼지 (pig)의 복부 바닥을 따라 시험품을 외과적으로 조합하여 위치시킴으로써 폐색이 유발되었고, 여기서 복부 내장의 중량이 임플란트를 압축하였고, 복막을 사용하여 도관을 피부로 연결하는 아트리움 절편을 형성함으로써 외부 환경으로부터의 배설물 축적 및 요 내 점액을 유발하였다 (돼지 (swine)의 경우 정상임).

[0628] 이러한 사지 동물 모델에서 고유한 관련 수술 후 합병증으로는 (i) 잠재적인 누관 형성을 가져오는 복부 유착 및 (ii) 복부 기관과 관련하여 시험품을 두는 위치가 포함된다.

[0629] 장이 부착된 기관인 경우, 장의 부착된 절편의 근육층은 아트리움 벽이 그런 것과 같이 유착 지점에서 종종 감소하거나 또는 손상되었다. 복벽을 통해 시험품의 뒤쪽 말단으로부터 피부로 연장되는 복막-유도된 관이 있는 복부의 복강 내에 시험품을 두었다. 시험품은 앞쪽 말단에서 수뇨관에 고정되었으나, 뒤쪽 말단에서 복막 랩핑 내에서 자유롭게 떠다녔다. 치유 결과 복부 (뒤쪽 말단)의 피부에서 수뇨관 (앞쪽 말단)으로부터 스토마 개구부로 순환되는 중앙 내강으로 구성되는 요로관이 생겼다. 요로상피 및 층상 평활근의 형성은 대부분 자주 도관의 앞쪽 말단에서 관찰되었고, 여기서 이식된 시험품은 복막 랩핑 내에 존재하였다. 복막으로부터 형성된 아트리움은 요로상피 덮개가 없는 섬유성 결합 조직 벽으로만 구성되었다.

[0630] 앞쪽 도관 (수뇨관 근처)에서 요로상피 및/또는 평활근 층의 발생율은 지지체-단독 군 (군 4)보다 구조물 군 (군 1, 2 및 3)에서 더 높았다. 임플란트의 뒤쪽 말단과 아트리움의 앞쪽 측면 사이의 경계를 부검시 구별하기 어렵기 때문에, 임플란트의 뒤쪽 말단 부근에서 취한 구획에서 관찰된 재생의 정도는 가변적이었다. 임플란트의 중간 구획에 있는 것으로 예상된 대부분의 구획 (구획 6 및 10, 도 59)에는 요로상피가 존재하지 않았다. 표 6.10은 네오-요로관에 대한 군별 연구 결과를 요약한 것이다.

[0631] [표 6.10]

| 처리 군 | 1<br>자가 방광 SMC | 2<br>자가 지방 SMC | 3<br>자가 혈액 SMC | 4<br>지지체 단독 |
|---|---|---|---|---|
| 평균 연구 일수 | 53 | 60 | 61 | 48 |
| 도관 위치에 의한 선별적인 연구 결과의 발생 (연구 결과가 있는 동물 수/상기 위치에서 검사한 동물 수) | | | | |
| 요로상피의 존재 | | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 13) | 5/8 | 6/8 | 7/8 | 3/7 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 15) | 7/8 | 6/8 | 4/7 | 4/7 |
| 도관 몸체의 수뇨관 말단 (슬라이드 5 또는 9) | 3/7 | 5/8 | 3/5 | 1/7 |
| 도관 몸체의 중간 (슬라이드 6 또는 10) | 0/6 | 1/7 | 1/5 | 1/7 |
| 도관 몸체의 스토마 말단 (슬라이드 7,8,11 또는 12) | 0/8 | 0/8 | 0/7 | 0/7 |
| 도관-스토마-피부 접합부 (슬라이드 17) | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 편평 상피의 존재 | | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 13) | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 15) | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 도관 몸체의 수뇨관 말단 (슬라이드 5 또는 9) | 0/7 | 0/8 | 1/5 | 0/7 |
| 도관 몸체의 중간 (슬라이드 6 또는 10) | 0/6 | 1/7 | 0/5 | 0/7 |
| 도관 몸체의 스토마 말단 (슬라이드 7,8,11 또는 12) | 6/8 | 3/8 | 4/7 | 2/7 |
| 도관-스토마-피부 접합부 (슬라이드 17) | 7/8 | 8/8 | 8/8 | 7/7 |
| 평활근의 존재 | | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 13) | 4/8 | 4/8 | 7/8 | 2/7 |
| 우측 수뇨관 도관 접합부 (슬라이드 15) | 4/8 | 4/8 | 5/8 | 3/7 |
| 도관 몸체의 수뇨관 말단 (슬라이드 5 또는 9) | 3/7 | 5/8 | 3/5 | 1/7 |
| 도관 몸체의 중간 (슬라이드 6 또는 10) | 0/6 | 1/7 | 1/5 | 1/7 |
| 도관 몸체의 스토마 말단 (슬라이드 7,8,11 또는 12) | 0/8 | 0/8 | 0/7 | 0/7 |
| 도관-스토마-피부 접합부 (슬라이드 17) | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 만성-활성 염증/배설물의 표면 | | | | |
| 좌측 수뇨관 도관 연접부 (슬라이드 13) | 5/8 | 5/8 | 1/8 | 6/7 |
| 우측 수뇨관 도관 연접부 (슬라이드 15) | 3/8 | 5/8 | 3/8 | 5/7 |
| 도관 몸체의 수뇨관 말단 (슬라이드 5 또는 9) | 5/7 | 6/8 | 3/5 | 6/7 |
| 도관 몸체의 중간 (슬라이드 6 또는 10) | 6/6 | 7/7 | 5/5 | 6/7 |
| 도관 몸체의 스토마 말단 (슬라이드 7,8,11 또는 12) | 8/8 | 7/8 | 7/7 | 7/7 |
| 도관-스토마-피부 접합부 (슬라이드 17) | 6/8 | 4/8 | 5/8 | 6/7 |
| 감쇠, 요로상피 | 1/8 | 3/8 | 3/8 | 0/7 |
| 증식증, 요로상피 | 3/8 | 6/8 | 5/8 | 4/7 |
| 액포 형성, 요로상피 | 6/8 | 6/8 | 6/8 | 4/7 |
| 장소의 GI 점막 | 1/8 | 2/8 | 0/8 | 0/7 |
| 이소성 뼈, 요로상피 하부 | 1/8 | 0/8 | 2/8 | 0/7 |
| 출혈, 도관 벽 | 0/8 | 3/8 | 1/8 | 2/7 |
| 광물화 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 지지체 물질 | 1/8 | 0/8 | 1/8 | 1/7 |
| 부착된 GI 관 (P=존재) | 6/8 | 6/8 | 1/8 | 5/7 |
| 부착된 비장 (P=존재) | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 1/7 |
| 부착된 정낭/자궁 (P=존재) | 0/8 | 0/8 | 2/8 | 0/7 |
| 혈관염/혈관 피저, 소 혈관 | 3/8 | 0/8 | 2/8 | 1/7 |
| 급성 염증/궤양화, 스토마 근처 피부 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |

[0632]

[0633] 표 6.11은 신장, 수뇨관 및 다른 조직에 대한 군별 연구 결과를 요약한 것이.

[0634] [표 6.11]

| 처리 군 | 1<br>자가 방광 SMC | 2<br>자가 지방 SMC | 3<br>자가 혈액 SMC | 4<br>지지체 단독 |
|---|---|---|---|---|
| 좌측 신장 | | | | |
| 수신증/만성 신장염 | 3/8 | 2/8 | 2/8 | 6/7 |
| 만성 신장염 (수신증 없음) | 1/8 | 2/8 | 1/8 | 0/7 |
| 신우신염 | 2/8 | 0/8 | 0/8 | 3/7 |
| 만성-활성 신장염 | 1/8 | 4/8 | 1/8 | 5/7 |
| 염증, 급성/아급성 | 1/8 | 1/8 | 0/8 | 0/7 |
| 재생, 관형 상피 | 5/8 | 6/8 | 4/8 | 1/7 |
| 관형 피저/유체/캐스트/사구체신염 | 1/8 | 2/8 | 0/8 | 1/7 |
| 바이러스성 함유물, 관형 상피성 세포 | 1/8 | 2/8 | 0/8 | 0/7 |

[0635]

[0636]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 혈관염/혈관 주변 염증 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 0/7 |
| 염증, 아급성, 신우 | 2/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 증식증, 이행 상피, 신우 | 1/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 염증, 만성-활성, 캡슐/복막 | 0/8 | 2/8 | 2/8 | 0/7 |
| 우측 신장 | | | | |
| 수신증/만성 신장염 | 3/8 | 2/8 | 3/8 | 5/7 |
| 만성 신장염 (수신증 없음) | 2/8 | 1/8 | 2/8 | 0/7 |
| 신우신염 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 3/7 |
| 만성-활성 신장염 | 1/8 | 2/8 | 0/8 | 1/7 |
| 염증, 급성/아급성 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 재생, 관형 상피 | 4/8 | 2/8 | 4/8 | 1/7 |
| 관형 괴저/유체/캐스트/사구체신염 | 1/8 | 2/8 | 0/8 | 0/7 |
| 바이러스성 함유물, 관형 상피성 세포 | 1/8 | 1/8 | 0/8 | 0/7 |
| 혈관염/혈관 주변 염증 | 3/8 | 0/8 | 2/8 | 0/7 |
| 염증, 아급성, 신우 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 증식증, 이행 상피, 신우 | 1/8 | 0/8 | 1/8 | 1/7 |
| 염증, 만성-활성, 캡슐/복막 | 1/8 | 2/8 | 0/8 | 0/7 |
| 좌측 수뇨관 | | | | |
| 확장 | 4/8 | 2/8 | 3/8 | 7/7 |
| 증식증, 이행 상피 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 액포 형성, 이행 상피 | 1/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 염증, 아급성/만성, 수뇨관 주위 장간막 | 3/8 | 4/8 | 5/8 | 3/7 |
| 혈관염/괴저, 장간막 혈관 | 4/8 | 1/8 | 1/8 | 1/7 |
| 내강 중 호중구 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 박테리아 색전증, 장간막 혈관 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 1/7 |
| 우측 수뇨관 | | | | |
| 확장 | 4/8 | 2/8 | 4/8 | 6/7 |
| 증식증, 이행 상피 | 1/8 | 0/8 | 0/8 | 0/7 |
| 액포 형성, 이행 상피 | 1/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 염증, 아급성/만성, 수뇨관 주위 장간막 | 1/8 | 3/8 | 6/8 | 1/7 |
| 혈관염, 장간막 혈관 | 4/8 | 1/8 | 2/8 | 1/7 |
| 림프절, 허리 | | | | |
| 증식증, 림프성 | 1/3 | 0/3 | 1/2 | U |
| 출혈 | 0/3 | 1/3 | 0/2 | U |
| 조직구증, 공동 | 1/3 | 3/3 | 1/2 | U |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 침윤물, 호중구 | 2/3 | 1/3 | 0/2 | U |
| 방혈, 림프구 | 1/3 | 3/3 | 1/2 | U |
| 림프절, 장간막 | | | | |
| 출혈 | 0/2 | 1/2 | 0/2 | U |
| 조직구증, 공동 | 0/2 | 1/2 | 1/2 | U |
| 방혈, 림프구 | 0/2 | 0/2 | 1/2 | U |
| 울혈 | 0/2 | 1/2 | 0/2 | U |
| 유착 및 누관 | | | | |
| 장에 부착된 도관 | 8/8 | 8/8 | 5/8 | 5/7 |
| 누관 (거시적 또는 임상적 관찰) | 5/8 | 7/8 | 6/8 | 2/7 |
| 누관/호중구 관 (미시적) | 3/8 | 6/8 | 4/8 | 1/7 |
| 누관 (거시적 또는 미시적) | 5/8 | 8/8 | 6/8 | 3/7 |
| 장에 유착된 수뇨관 | 1/8 | 1/8 | 3/8 | 2/7 |
| 비장에 유착된 도관 | 0/8 | 0/8 | 0/8 | 2/7 |
| 정낭에 유착된 도관 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 자궁에 유착된 도관 | 0/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 자궁에 유착된 수뇨관 | 1/8 | 0/8 | 1/8 | 0/7 |
| 총 병변: | | | | |
| 복벽 | | | | |
| 이소성 골, 스토마 근처 (P=존재) | 4/4 | 3/5 | 2/2 | 1/1 |
| 염증, 만성-활성, 복막 | 1/4 | 2/5 | 0/2 | 0/1 |
| 섬유증, 근막 | 0/4 | 1/5 | 0/2 | 1/1 |
| 위장 | | | | |
| 융모 위축 | 2/2 | 0/1 | 0/1 | U |
| 울혈 | 0/2 | 1/1 | 0/1 | U |
| 점액질의 증식증, 위 | 0/2 | 0/1 | 1/1 | U |
| 간 | | | | |
| 염증, 만성-활성, 캡슐/복막 | U | 1/1 | U | U |
| 폐 | | | | |
| 염증, 급성/아급성, 다초점형 | 1/1 | 0/1 | 3/3 | U |
| 박테리아 콜로니, 다초점형 | 1/1 | 0/1 | 1/3 | U |
| 혈관염, 괴사형/혈전 | 1/1 | 0/1 | 0/3 | U |
| 염증, 만성, 흉막 | 0/1 | 1/1 | 0/3 | U |
| 림프절, 서혜부 | | | | |
| 출혈 | 1/1 | 0/2 | U | U |
| 침윤물, 호중구 | 1/1 | 0/2 | U | U |
| 증식증, 림프성 | 0/1 | 2/2 | U | U |
| 방혈, 림프구 | 1/1 | 0/2 | U | U |
| 조직구증, 공동 | 0/1 | 1/2 | U | U |
| 장막 | | | | |

[0637]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 염증, 만성-활성 | U | 3/3 | U | U |
| 췌장 | | | | |
| 자가용해 (P=존재) | 1/1 | 2/4 | U | U |
| 염증, 만성-활성, 복막 | 0/1 | 2/4 | U | U |
| 정낭 | | | | |
| 염증, 만성-활성 (확대됨) | 1/2 | U | U | U |
| 피부, 귀 | | | | |
| 혈관염, 괴사형 | U | 1/1 | U | U |
| 비장 | | | | |
| 염증, 만성, 복막 표면 | U | U | U | 1/1 |
| 자궁 | | | | |
| 수뇨관에 부착된 자궁 (P=존재) | 1/1 | U | U | U |

[0638]

[0639] 요로상피 재생은 시험품 내 세포의 존재에 따라 좌우되지 않고 도관 내강에 대면하는 아트리움 표면상에서 일어날 것이라고 예상되지 않았고, 이에 따라 비뇨기 조직 재생의 평가는 도관의 앞쪽 말단으로 제한되었다 (5, 9, 13 및 15절).

[0640] 시험품의 배치 및 위에 놓인 복부 기관의 중량은 열악한 배출 및 모든 군의 내강내의 배설물 축적에 기여할 수 있지만, 부검시 지지체-단독 임플란트를 수용하는 동물에서 독특한 발견을 할 수 있었다. 상부 요로 병변의 존재는 간헐성 또는 완전 폐색증과 연관되어 - 앞쪽 도관 내의 곁주머니 형성 및 수뇨관 및 신장 손상 발생에 의

해 입증되는 - 소변의 역압을 야기하였다. 어떠한 군에서도 수뇨관 또는 도관 협착증의 징후는 관측되지 않았다. 그러나 군 4 동물들은 군 1, 2 및 3 동물들에 비해 수뇨관증 및 수신증 발생이 증가하였다 (각각 합하여 100% 및 69%). 지지체-단독 시험품 내의 SMC의 부재는 폐색증 이후의 사망률 및 비뇨기 조직의 불완전한 발달의 증가에 기여하는 것으로 여겨지며, 지지체-단독 시험품이 추가 발달에 부적합하다는 결정을 유도하였다.

[0641] 점막, 점막밑 및 섬유혈관 기질을 갖는 평활근을 특징으로 하는 비뇨기 조직-유사 재생은 SMC 공급원 (즉 방광, 지방 또는 혈액)에 관계없이 구조물 시험품 이식 후에 관측되었다. 대조적으로, 제한된 평활근으로 섬유혈관 기질에 의해 지지되는 비정상적 점막을 특징으로 하는 지지체-단독 시험품의 이식 후에 회복 과정이 관측되었다. 구조물 군 내의 비뇨기-유사 조직 재생 정도는 동물 이식 후 생존 기간에 의해 영향을 받았다.

[0642] 도 60 내지 63은 네오-요로관의 현미경 사진을 제공한다. 도 60은 군 2의 암컷 동물 11로부터의 NUC의 앞쪽 부분의 현미경 사진 (마손 3색 염색)을 나타낸다. 요로상피는 평활근 층 위에 존재한다.

[0643] 도 61은 군 1의 암컷 동물 1로부터의 NUC의 앞쪽 부분의 현미경 사진 (마손 3색 염색)을 나타낸다. 요로상피는 평활근 층 위에 존재한다.

[0644] 도 62는 군 2의 수컷 동물 15로부터의 좌 수뇨관 부근 NUC의 현미경 사진 (마손 3색 염색)을 나타낸다. 요로상피는 평활근 층 위에 존재한다.

[0645] 도 63은 군 1의 수컷 동물 5로부터의 NUC 벽의 현미경 사진 (마손 3색 염색)을 나타낸다. 이 수준에서, 도관 벽은 섬유상 결합 조직으로 구성된다. 배설물은 관강 표면을 덮는다. 상기 외관은 NUC의 뒤쪽 부분에서 가장 빈번하게 관측되었다.

[0646] **결론**

[0647] 외과 수술 이식 부위 및 내강을 압박하는 복부 내용물의 결과로서의 요류의 PCV-2 바이러스 감염 및 부분 내지 완전한 비뇨기 폐색증은 예정치 못한 23/24 사망에 기여하였다. 내강의 압박 및 비뇨기 폐색증과 관련하여, 유착, 누관, 수뇨관증, 수신증 및 신우신염이 발견되었다. 생존 동안의 합병증 관련 외과 수술 절차는 예정치 못한 1/24 사망에 기여하였다.

[0648] 구조물 시험품 중 임의의 것으로부터 유래된 도관의 부분에서 치유 및 재생이 관측되었고 지지체-단독 시험품으로부터 유래된 도관에서는 치유 및 회복이 관측되었으며, 이는 구조물 이식이 점막 및 평활근 층으로 구성된 비뇨기-유사 조직 벽을 갖는 도관의 형성을 야기함을 증명한다.

[0649] 구조물 시험품 (재생)과 지지체-단독 시험품 (복구) 사이의 치유에 있어서의 차이는 지지체-단독 시험품에 대해 관측되는 현저한 신장 소견의 보다 높은 발생에 기여하며, 지지체-단독 시험품이 추가 발달을 위해 부적합하다는 결정을 유도한다.

[0650] 구조물 시험품들 사이의 재생 과정에서 관측된 차이점은 없었으며, 이는 재생 촉진에 있어서 SMC 공급원 사이의 동등성을 제안한다.

[0651] 실시예 7 - SMC로 시딩된 네오-요로관 지지체의 생체내 이식

[0652] 상부 요로에의 손상 또는 대사성 비정상성의 징후 없이 소변이 수뇨관에서 체외로 유동하는 것을 가능케 할 것인 재생 네오-요로관 (NUC)을 생성하기 위한 합성 지지체 (PGA) 및 세포 기반 구조물의 잠재력을 평가하기 위해 돼지 모델을 사용하는 3개월 전임상 연구를 실행하였다 (실시예 3의 프로토콜에 따름).

[0653] 실금 요로 전환술을 확립하기 위한 SMC-시딩된 PLGA-기반 생분해성 지지체, 또는 네오-요로관 (NUC) 사용의 실행가능성을 평가하였다. 지지체-단독 대조군 및 혈액, 지방 또는 방광으로부터 단리된 자가 SMC로 시딩된 NUC를 경피 전환술 돼지 모델에서 3개월 동안 평가하였다. 배뇨량은 도관 내강 및 스토마의 수술 후 조기 관리에 의해 유지하였다.

[0654] 혈액원, 지방원 또는 방광원으로부터 얻어진 평활근 세포 (SMC)로 구성된 구조물은 상부 요로에 변경을 일으키지 않은 평활근 층 및 요로상피 세포 내층으로 구성된 개방 도관을 재생시켰다. 상승된 크레아틴, 대사 비정상성 또는 변경된 혈액학적 파라미터에 대한 징후는 발견되지 않았다.

[0655] NUC 전환술은 세포 공급원에 관계없이 재생된 비뇨기 조직 (요로상피 세포 내층 및 혈관 평활근 벽)으로 구성된 도관 내에 발달되었다. 상부 요로에 대한 현저한 변경, 크레아틴 상승, 또는 혈액학적 또는 대사적 비정상성은 관측되지 않았다. 대조적으로, 지지체-단독 이식된 동물은 섬유상 결합 조직으로 주로 구성되고 평활근 발달이

제한된 개방 요로상피 내층형 도관이 발달하였다. 상기 군도 또한 높은 빈도의 수뇨관증 및 수신증을 겪었다. 두 군 모두에서, 연구 기간 동안 개방성을 유지하기 위해 도관 내강 및 스토마의 수술 후 조기 관리가 요구되었다.

[0656] 도 64는 네오-방광 도관을 형성하는 재생된 비뇨기 조직의 조직학적 특성이 SMC 공급원에 관계없이 유사함을 나타낸다. 분석은 중간 분석 (48일)으로 및 연구의 종결시 (3개월 최종 희생) 실행하였다.

[0657] 상기 연구는 다양한 근원 (혈액, 지방 또는 방광)으로부터의 자가 SMC로 시딩된 합성 네오-요로관 (NUC)이 소변 제거의 방광 절제술 후 관리를 위한 개방 실금 요로 전환술을 확립할 수 있음을 증명한다. NBC-이식된 동물은 보통 GI-유도 요로 전환술 또는 지지체-단독 임플란트와 관련된 어떠한 후유증도 나타내지 않았다. 네오-방광 도관은 실금 요로 전환술에 의한 방광 절제술 후 관리를 위한 GI 조직의 대안을 나타낼 수 있다.

[0658] 문헌 [Pirker et al. (2007) J Urol. Apr;177(4):1546-51]에 따르면, 수뇨관-방광 접합부 (UVJ)의 3개의 근육 성분은 임신 나이 60일에 돼지 태아에서 쉽게 구별할 수 있었다. 이는 1) 수뇨관 (U) 평활근, 2) 배뇨근 (D) 평활근 및 3) 수뇨관 주위 시스(sheath) 평활근을 포함하였다. 수뇨관 평활근은 다수의 작은 직경의 근육 신경 다발 (긴 화살표)을 특징으로 하였고, 배뇨근 근육은 여러 방향으로 나아가는 큰 직경의 근육 다발, 및 벽내 수뇨관에 따른 중간 섬유 크기, 위치, 및 배치 (짧은 화살표)에 의해 모든 연령 군에서 구별할 수 있는 수뇨관 주위 시스의 근섬유로 이루어진다. U = 수뇨관 내강; B = 방광 내강, α-SMA 염색, x40에서 축소됨. 이는 도 65에 나타내었다.

[0659] 도 66에 나타내어진 바와 같이, 82일 후 지방 군 동물은 신규하게 형성된 수뇨관-도관 접합부 (UCJ)와 피커 (Pirker)의 UVJ 묘사 사이의 유사성을 나타내었다. 조직학적으로, UCJ 단편은 기본적으로 60 내지 90일 연령의 돼지 태아의 발생학적 발달과 유사성을 나타내었다. 마손 3색 염색한 UCJ의 조직학적 단편. 본래 총 배율 10x. U = 수뇨관 내강; C = 도관 내강, 그리고 화살표는 수뇨관 및 수뇨관 주위의 유사성을 갖는 근섬유의 혼합물을 나타낸다.

[0660] 도 67은 이식된 도관의 조직 구조를 나타내고 평활근 세포 벽, 복벽, 요로상피 세포 덮개, 도관, 및 도관 내강 위치를 나타낸다.

[0661] 실시예 8 - 비-방광 세포 공급원으로부터의 새로운 기능적 네오-요로관

[0662] 여기서는 방광-유래된 평활근 세포와 표현형적으로 및 기능적으로 구별할 수 없는, 돼지 말초 혈액 및 지방으로부터의 평활근 세포의 단리 및 특성화를 기재한다. 본 발명자들은 말초 혈액 및 지방 유래된 평활근 세포를 사용하여 생분해성 관형 합성 지지체 구조를 시딩할 수 있고 상기 시딩된 지지체를 돼지 방광 절제술 모델에 이식하는 것은 방광 유래된 평활근 세포가 시딩된 것과 기능적으로 구별할 수 없는 네오-요로관의 성공적인 재생을 유발한다는 것을 증명하였다. 말초 혈액 또는 지방 유래된 평활근 세포에 의해 시딩된 지지체로부터 다시 비뇨기 구조를 생성하는 능력은 비뇨기 조직 엔지니어링 기술의 임상 실시로의 이행을 매우 용이하게 할 것이다.

[0663] 평활근 세포는 또한 다른 조직 공급원, 예컨대 골격근 및 그물막으로부터 단리되지만 (문헌 [Wilschut et al. J Cell Biochem 105, 1228-1239 (2008)]; [Hernando et al. Eur J Vasc Surg 8, 531-536 (1994)]), 본 발명자들은 말초 혈액 및 지방으로부터의 평활근 세포가 샘플 수집의 용이성의 관점에서 유리한 잠재적인 임상 이용가능성을 갖는 근원 조직을 대표하기 때문에 말초 혈액 및 지방으로부터의 평활근 세포의 회복에 초점을 맞추었다. 돼지 방광 절제술 모델을 선택하여 적용시 세포/지지체 복합체 내의 방광-유래된 평활근 세포에 비례하여 말초 혈액- 및 지방-유래된 평활근 세포의 성능을 평가하였다 (문헌 [Baldwin et al. J. Endourol. 17, 307-312 (2003)]; [Akbal et al. J Urol. 176, 1706-1711 (2006)]).

[0664] 도 68은 돼지 (A) 방광-, (B) 지방-, 및 (C) 말초 혈액-유래된 평활근 세포를 나타낸다. 3종의 모든 조직 유형으로부터의 평활근 세포는 평평한 방추형 섬유모세포 외관 및 선회형 "골-및-마루" 구조를 비롯한 완전히 분화된 평활근의 형태학적인 특징을 공유한다.

[0665] 도 69는 돼지 방광-, 지방-, 및 말초 혈액- 유래된 평활근 세포로부터의 마커 관련 평활근 세포의 RT-PCR 분석을 나타낸다. 마커 SMαA, SM22, 마이오카딘, SMMHC 및 칼포닌 관련 평활근 세포의 발현은 조직 공급원에 관계없이 모든 평활근 세포 유형에서 유사하다. 샘플은 RNA의 질량 및 β-액틴의 발현에 의해 표준화한다. 숫자는 1차 세포 배양이 유래된 개개의 돼지를 나타낸다.

[0666] 도 70은 돼지 방광, 지방 및 말초 혈액-유래된 평활근 세포로부터의 마커 관련 평활근 세포의 면역-형광 분석을 나타낸다. 지방-유래된 SMC 음성 대조군 (IgG 동형)에서 SM22가 검출가능한 염색을 나타내지 않은 것을 제외하

곤, 마커 SMαA, SM22, SMMHC 및 칼포닌 관련 평활근 세포의 발현은 조직 공급원에 관계없이 모든 평활근 세포 유형에서 유사하다 (데이터는 나타내지 않음).

[0667] 돼지로부터의 말초 혈액-유래된 단핵 분획의 직접적인 평판 배양은 전형적인 평활근 세포 형태를 갖는 콜로니의 증식을 야기하였다 (도 68). 스크리닝 (n=24)한 모든 동물 (100%)은 50 mL의 말초 혈액으로부터 영점 통과시 회복된 2.44 x $10^3$ 내지 2.37 x $10^6$개의 평활근 세포를 갖는 평활근 세포 콜로니를 생성하였다. 평활근 세포의 회복은 배지 제형물, 세포 밀도 또는 표면 코팅의 변화에 의해 영향을 받지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 유사한 접근법을 사용하여 피하 또는 지방흡인-유래된 지방의 평활근 세포 공급원으로서의 잠재적인 적용을 조사하였다. 지방의 기질-혈관 분획 (SVF)은 제한된 중간엽 잠재력을 갖는 전구세포, 내피 세포 및 평활근 세포를 포함한 세포의 불균질 집단을 나타낸다[22]. 본 발명자들은 돼지 지방으로부터의 평활근 세포의 콜로니 (단층으로 팽창가능함)를 100% 효율로 (n=24) (도 68), 1.37 x $10^5$ 내지 4.36 x $10^5$ 세포/g 지방 조직의 세포 회복 속도로 생성할 수 있었다. 대조적으로, 평활근 세포는 1.29 x $10^6$ 내지 9.3 x $10^6$ 세포/g 방광 조직의 회복 속도로 방광 조직으로부터 단리할 수 있었다. 말초 혈액 또는 지방으로부터의 평활근 세포 콜로니의 팽창은 배양된 방광-유래된 평활근 세포의 특징적인 전형적 선회형 "골-및-마루" 구조를 갖는 세포 단층의 형성을 야기하였다 (도 68).

[0668] 평활근 세포의 증식은 중간엽 줄기 세포의 성장 및 증대에 대해 구체적으로 선택되는 것으로 나타내어지는 높은 세포 밀도 및 높은 글루코스 배지를 사용함으로써 용이하게 하였다 (문헌 [Lund et al. 2009 supra]). 상기 목적을 위해, 지방-유래된 평활근 세포와 중간엽 줄기 세포 사이의 표현형적 및 기능적 특성의 주요 차이를 증명하는 체계적인 비교 분석을 실행하였다 (하기 실시예 참조).

[0669] 말초 혈액 또는 지방-유래된 평활근 세포의 기능적 특성의 시험관내 분석은 이들을 방광-유래된 평활근 세포로부터 구별할 수 없다는 것을 증명한다. 평활근 수축성과 관련된 단백질의 증가된 발현은 평활근 세포 분화 및 성숙의 특징적인 특징이다 (문헌 [Jeon et al, 2006 supra]; [Ross et al., 2006 supra]; [Sinha et al., 2004 supra]). 마이오카딘은 평활근 세포 분화에 요구되는 주요 전사 인자이고 SM22, α-평활근 액틴 (SMαA), 평활근 마이오신 중쇄 (SMMHC) 및 칼포닌 (CNN)을 비롯한 수축성에 필수적인 평활근 마커의 발현을 매개하기 위해 작용한다.

[0670] 평활근 마커 SMMHC 및 CNN의 발현은 일반적으로 성숙 평활근 세포의 진단물로 고려된다 (상기 문헌 [Qiu et al., 2005]; [Wang et al., 2003]; [Yoshida et al., 2003]). 도 69에 나타낸 바와 같이, 이러한 핵심 평활근 세포 마커의 발현의 반-정량적 RT-PCR 분석은, 혈액 및 지방-유래 평활근 세포가 방광-유래 평활근 세포와 직접적으로 유사하다는 것을 증명한다.

[0671] 이들 결과는 평활근 세포 특이적 단백질 발현의 면역-형광 분석으로 확인되었다. αSMA, SM22, CNN 및 SMMHC는 방광-유래 평활근 세포에서 발견된 바와 동일한 국소화 패턴으로 말초 혈액 및 지방-유래 평활근 세포에서 발현되었다 (도 70). 스트레스 섬유에 대한 국소화는 방광-유래 평활근 세포에 대해 전형적인 바와 같이 관찰되었다. SM22의 염색은 지방-유래 평활근 세포에서 약한 것으로 관찰되었다.

[0672] 도 71은 돼지 (a) 방광-, (b) 지방- 및 (c) 말초 혈액-유래 평활근 세포의 수축성을 나타낸다. 3종의 조직 공급원 모두로부터의 평활근 세포는 콜라겐 겔 매트릭스에서 $Ca^{2+}$ 의존성 수축성을 나타낸다. 숫자는 개별 동물로부터 유래한 세포주를 나타낸다.

[0673] 말초 혈액 및 지방-유래 평활근 세포의 기능성을 3차원 $Ca^{2+}$-의존성 수축성 검정으로 추가 평가하였다. 평활근 세포는 3차원 겔에 포획시 $Ca^{2+}$-의존성 방식으로 콜라겐 매트릭스의 수축을 자발적으로 유도한다 (상기 문헌 [Travis et al. 2001]). 도 71에 나타낸 바와 같이, 샘플-대-샘플 편차가 관찰되었지만, 말초 혈액 및 지방-유래 세포는 방광-유래 평활근 세포와 유사한 정도로 수축되고, 이러한 수축성은 $Ca^{2+}$ 킬레이터로 공지된 EDTA에 의해 억제되었다.

[0674] 도 72a-c는 돼지 (a) 방광-, (b) 지방- 및 (c) 말초 혈액-유래의 평활근 세포의 성장 역학을 나타낸다. 숫자는 개별 동물로부터 유래한 세포주를 나타낸다.

[0675] 비뇨기 재생 의학에서의 지방 및 말초 혈액-유래 평활근 세포의 사용은 허용되는 시간 범위 내에 충분한 세포수를 확보할 수 있다는 것을 조건으로 한다. 상기 목적을 위해, 본 발명자들은 평활근 세포 결장 (돼지 말초 혈

액의 50 ml 샘플 또는 7-25 g 돼지 지방)이 시딩 후 7일 이내에 확인될 수 있고, 14일 이내에 계대될 수 있다는 것을 발견하였다. 도 72a-c에 나타낸 바와 같이, 알려지지 않은 이유로 증식에 실패한 1개의 방광 평활근 샘플을 제외하고는, 백만 내지 수천만 개의 평활근 세포가 2-4주 이내에 방광, 말초 혈액 또는 지방으로부터 회수되었다 (n=24). 방광 및 지방-유래 평활근 세포를 2계대 동안 증식시킨 후, 합성, 네오-요로관 지지체를 시딩하기 위해 세포를 수거하였다. 말초 혈액-유래 평활근 세포는 3-4계대 동안 증식시켜 동등한 세포수를 생성하였다. 평균적으로, 30-40 x $10^6$개의 평활근 세포를 사용하여 네오-요로관 지지체를 시딩하였다.

[0676] 본 발명자들은, 방광-유래 평활근 세포가 생중합체 지지체를 시딩하는 데 사용되어, 방광 방광적출술의 생체내 임상 모델에 이식된 후 합성, 충분한 기능적 신-방광 확대를 재생시킬 수 있다는 것을 이미 제시한 바 있다 (상기 문헌 [Jayo I]). 그러나, 방광-유래 평활근 세포의 사용이 임상적으로 이상적이지 않을 수 있으므로, 본 발명자들은 요실금의 3개월령 돼지 임상 모델에서 말초 혈액 및 지방-유래 평활근 세포의 생체내 임상 효능을 평가하는 것을 진행하였다 (상기 문헌 [Baldwin et al. 2003]; 상기 문헌 [Akbal et al. 2006]). 방광, 지방 및 말초 혈액-유래 평활근 세포를 PGA/PLGA-기재의 지지체를 시딩하는 데 사용하여, 수뇨관으로부터 체외 표면으로 바로 유출되는 것을 허용하는 재생, 네오-요로관을 생성하였다. 본 발명자들은, 혈액 또는 방광 공급원으로부터 수득한 평활근 세포로 이루어진 구조물이 상부 요로를 변형시키지 않는 요로상피 세포 내층 및 평활근층으로 이루어진 명백한 도관을 재생시켰다는 것을 발견하였다. 증가된 크레아티닌, 대사 비정상 및 변경된 혈액학적 파라미터에 대한 증거는 발견되지 않았다.

[0677] 도 73은 지방-, 말초 혈액- 및 방광-유래 평활근 세포-시딩된 합성 지지체를 이용한 돼지 방광적출술 모델에서의 네오-요로관의 재생을 나타낸다. 지방-, 말초 혈액-, 또는 방광-유래 평활근 세포로 시딩된 네오-요로관 합성물은 요로상피 및 평활근 층을 갖는 방광-유사 조직을 재생시켰다. 평활근 세포 다발이 수뇨관/지지체 접합부에 인접한 네오-요로관의 앞등쪽/배쪽 측면에서 발견되었다. 모든 군에서, 섬유모세포 및 평활근 세포는 도관의 중간-부분으로부터 수득된 대표적인 절편에서 발견되었다. 지지체-단독 군은 주로 섬유성 결합 조직으로 이루어진 네오-요로관을 발달시키고, 복구와 관련된 평활근 다발을 제한하였다. 마손 3색 염색을 이용하여, 재생된 평활근 다발 (적색) 및 콜라겐 풍부 매트릭스 내 섬유모세포 및 평활근 세포로 이루어진 초기 세포 조직화의 존재 (청색)를 확인하였다. 핵은 암갈색으로 염색되었다. 모든 군에서, 섬유모세포 및 평활근 세포는 도관의 중간-부분으로부터 수득된 대표적인 절편에서 발견되었다. 보다 높은 농도의 콜라겐이 각각 마손 3색 염색으로부터 청색 염색을 특징으로 한 방광 및 지지체 군에서 발견되었다. 지지체 단독 군은 주로 섬유성 결합 조직으로 이루어진 네오-요로관을 발달시키고, 평활근 다발을 제한하였다.

[0678] 도 73에 나타낸 바와 같이, 네오-요로관을 형성하는 재생된 요로 조직의 조직학적 특성은 평활근 세포 집단의 기원에 관계없이 일반적으로 유사하였다. 대조적으로, 지지체-단독 이식된 동물은 주로 섬유성 결합 조직으로 이루어진 명백한 요로상피-연결된 도관을 발달시키고, 평활근 발달을 제한하였다. 두 군 모두에서, 연구 기간 동안 명백함을 유지하기 위해서 도관 관강 및 스토마의 초기 수술 후 관리가 요구되었다.

[0679] 상기 연구는, 여러 가능한 세포 공급원 (혈액, 지방 또는 방광)으로부터 유도된 자가 평활근 세포로 시딩된 합성, 생분해성 지지체 합성물이 전임상 돼지 모델에서 명백한 네오-요로관을 다시 제조하는 데 사용될 수 있음을 증명한다. 말초 혈액 또는 지방-유래 평활근 세포로 시딩된 합성 지지체로부터 비뇨기 구조물을 새로 제조하는 상기 능력은 비뇨기 조직 공학 기술의 임상 실습으로의 해석을 매우 용이하게 할 것이다.

[0680] 물질 및 방법.

[0681] 돼지 방광, 지방 및 말초 혈액으로부터 평활근 세포의 생성. 평활근 세포를 자가 네오-요로관 구조물의 생성에서 사용하기 위해서 방광 및 지방 생검 뿐만 아니라 말초 혈액 채혈로부터 단리하였다. 1 $cm^2$ 방광 생검 표본, 2 $cm^2$ 지방 생검 표본, 및 50 mL의 말초 혈액을 대략 8주 동안 24마리의 괴팅겐 돼지 각각으로부터 수득한 후, 최종 네오-요로관을 계획적으로 이식하였다.

[0682] 방광-유래 평활근 세포의 단리를 위해서, 요로상피 세포 층을 방광 생검으로부터 절제하고, 남은 평활근 층을 1 $mm^2$ 조각으로 자르고, 조직 배양 플레이트의 표면 상에 배열하였다. 생검 조직을 생물안전 작업대에서 10-30분 동안 건조시켰다. DMEM-HG (기브코(Gibco)) + 10% FBS를 생검 샘플에 첨가하고, 플레이트를 5% $CO_2$에서 습윤화된 37℃의 인큐베이터에서 인큐베이션하였다.

[0683] 지방 조직 (7-25 g)을 PBS로 3회 세척하고, 매스 및 가위로 잘게 자르고, 50 mL 코니칼 튜브로 옮기고, DMEM-HG 중 0.3% 콜라게나제 (워싱톤(Worthington)) 및 1% BSA의 용액에서 60분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 상기

튜브를 계속 흔들거나 정기적으로 진탕하여 소화를 용이하게 하였다. 기질-혈관 분획을 600 g에서 10분 동안 원심분리하여 펠렛화하고, DMEM-HG + 10% FBS에 재현탁시켰다. 이어서, 기질-혈관 분획을 사용하여 계대 0을 시딩하였다.

[0684] 25 ml의 돼지 말초 혈액을 PBS에서 1:1로 희석하고, 50 mL 코니칼 튜브에서 25 ml 히스토파퀴(Histopaque)-1077 (시그마)을 사용하여 층상화하였다. 원심분리 (800 g, 30분) 후, 단핵 분획을 수집하고, PBS로 1회 세척하고, α-MEM/10% FBS (인비트로겐(Invitrogen)) 중에 재현탁시켜 계대 0을 시딩하였다.

[0685] **네오-요로관 세포/지지체 합성물의 어셈블리.** 방광, 지방 및 말초 혈액-유래 평활근 세포를 7주 이하 동안 따로 증식시켜 NUC 지지체를 시딩하는 데 필요한 $10^7$개 세포를 생성하였다. 방광 및 지방-유래 평활근 세포를 2계대 동안 증식시킨 후, 지지체를 시딩하기 위한 세포를 수거하여 최종 구조물을 제조하였다. 말초 혈액-유래 평활근 세포 배양물을 P3-4로 증식시킨 후, 지지체 시딩을 위해 수거하였다. NUC 지지체를 제작하기 위해서, PGA 펠트를 일정 크기로 자르고, NUC 모양으로 봉합하고, PLGA로 코팅하였다. 이어서, 상기 구조물을 에틸렌 옥시드를 사용하여 멸균하였다. 세포 시딩 하루 전에 NUC 지지체를 60% 에탄올/40% D-PBS, 100% D-PBS, D-MEM/10% FBS 또는 α-MEM/10% FBS로 포화시켜 연속적으로 미리-습윤화한 후, D-MEM/10% FBS 또는 α-MEM/10% FBS 중 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, NUC 지지체를 방광-, 지방- 또는 말초 혈액-유래 평활근 세포로 시딩하고, 시딩된 구조물을 5% $CO_2$에서 습윤화된 37℃의 인큐베이터에서 자가 숙주 돼지 내 이식이 이루어질 때까지 (제7일까지) 성숙시켰다.

[0686] RNA의 단리 및 반-정량화 RT-PCR 분석. RNeasy 플러스 RNA 미니(RNeasy Plus RNA Mini) 단리 키트 (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 돼지 방광, 지방 및 말초-혈액 유래 평활근 세포로부터 RNA를 단리하였다. 각각의 샘플로부터의 RNA 1 μg을 퀀티텍트(Quantitect) cDNA 합성 키트 (인비트로겐)를 사용하여 역-전사시켰다. 다음의 평활근 세포 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR 반응 (5'-3')을 설정하였다: *β-액틴* (F: TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG, R: CGT TCA CAC TTC ATG ATG GAG T), *SM22* (트랜스겔린(transgelin)) (F: GAT CCA ACT GGT TTA TGA AGA AAG C, R: TCT AAC TGA TGA TCT GCC GAG GTC), *SMαA* (F: CCA GCA GAT GTG GAT CAG CA, R: AAG CAT TTG CGG TGG ACA AT), *SMMHC* (F: GCT CAG AAA GTT TGC CAC CTC, R: TCC TGC TCC AGG ATG AAC AT), *CNN* (칼포닌) (F: CAT GTC CTC TGC TCA CTT CAA C, R: CCC CTC GAT CCA CTC TCT CA), *MYOCD* (F: AAG AGC ACA GGG TCT CCT CA, R: ACT CCG AGT CAT TTG CTG CT). 순환 조건: 변성 95° (2분), 변성 95° (45초), 어닐링 (45초), 신장 72° (45초), 최종 신장 72° (5분). 35회 주기 (마이오카딘(myocardin) 40회 주기). 어닐링 온도: β-액틴=58°, SM22=56°, SMαA=55°, SMMHC=60°, CNN=51°, MYOCD=52°. 고택 그린(GoTaq Green) PCR 믹스 (프로메가(Promega))를 사용하고 아이큐사이클러(iQcycler) (바이오-래드(Bio-Rad)) 상에서 순환시켜 PCR 반응을 수행하였다.

[0687] 면역-형광 분석. 다음의 항체를 면역-형광 분석에 사용하였다: SMαA (다코(Dako) #M0851), CNN (다코 #M3556), SM-MHC (시그마 #M7786), 마이오카딘 (산타 크루즈(Santa Cruz) #SC3428), SM22 (아브캄(Abcam) #ab28811-100), 항-msIgG1/알렉사플루오르(Alexafluor) 488 (인비트로겐 #A21121), 항-msIgG2a/알렉사플루오르 488 (인비트로겐 #A21131), 항-gtIgG/알렉사플루오르 488 (인비트로겐 #A11055). SMMHC를 10 μg/ml의 농도로 사용한 것을 제외하고는, 모든 1차 항체를 5 μg/ml의 최종 농도로 사용하였다.

[0688] 수축성 검정. 상기 기재된 바와 같이 수축성 검증을 수행하였다 (상기 문헌 [Travis et al., 2001]).

[0689] 성장 역학. 네오-요로관 지지체의 시딩을 위한 조직 단리물로부터의 평활근 세포의 증식은 연속 계대 배양에 의해 ≥70%로 전면성장하였다.

[0690] **돼지 방광적출술 모델에서 신 네오-요로관 형성의 GLP 전임상 분석.** 전체 방광적출술 및 요실금 수뇨관조루술을 받은 32마리의 괴팅겐 돼지 (데이터 포인트 당 각각 4마리의 수컷 및 4마리의 암컷으로 이루어진 8 마리의 동물)를 GLP 전임상 분석에서 이용하여 방광, 혈액 또는 지방 조직 유래의 자가 평활근 세포로 시딩된 조직-공학적 NUC 구조물의 안전성 및 기능성을 측정하였다. 32마리의 동물 중, 제군 1 (수컷 4마리, 암컷 4마리)은 방광-유래 평활근 세포로 시딩된 NUC를 이식받았다. 제2 군은 지방-유래 SMC로 시딩된 NUC 지지체를 이식받고, 제3 군은 혈액-유래 SMC로 시딩된 NUC 지지체를 이식받고, 제4 군은 시딩되지 않은 NUC 지지체만을 이식받았다. 장치 효과 및 수행을 초음파 영상화, 신우조영술, 및 또한 연구 중 다양한 시점의 소변 및 혈액 분석을 통해 모니터링하였다. 회복 기간의 완료 시점에 (84 +/-5일), 모든 동물을 안락사시키고, 부검을 수행하여 신장, 도관, 및 조직학적 준비 및 병리학적 검사를 위한 관련 기관 및 조직을 수거하였다.

[0691] 실시예 9 - 돼지에서 네오-요로관의 평가

[0692] 상기 연구의 목적은, 방광의 외과적 제거 (근치적 방광적출술) 및 NUC 구축 임플란트 시스템의 유입 말단으로의 수뇨관의 전환술 후 도관 이식 및 조직 재생을 위한 방광, 혈액 또는 지방으로부터 유래된 자가 평활근 세포로 시딩된 텐젼(Tengion)의 네오-요로관 (NUC) 구조물의 사용의 안정성 및 기능성을 측정하는 것이다. 페리토네운(Peritonewn)을 사용하여 전체 구조물을 감쌀 것이다. 구조물의 배수 유출 말단은 요를 통과하기 위해서 외과적으로 생성된 스토마를 향해 부착될 것이다. 상기 연구에서, 네오-요로관 구조물의 수행능, 및 관련 기관 및 조직에 대한 효과를 평가할 것이다. 종점 측정법으로는 신우조영술, 초음파, 혈액 분석 및 조직병리학을 들 수 있다.

[0693] 20마리의 동물 (10F, 10M)을 상기 연구에 참여시킬 것이다. 자가 방광 SMC를 갖는 4마리의 동물 (2F 및 2M)을 갖는 한 (I) 군이 있다. 각각 자가 지방 SMC 및 자가 혈액 SMC를 갖는 8마리의 동물 (4F, 4M)을 갖는 두 군이 있다. 제1 군은 방광-유래 SMC로 시딩된 NUC 지지체를 이식받을 것이다. 제2 군은 지방-유래 SMC로 시딩된 NUC 지지체를 이식받을 것이며, 제3 군은 혈액-유래 SMC로 시딩된 네오-요로관 지지체를 이식받을 것이다. 장치 효과 및 수행을 초음파 영상화, 신우조영술, 및 연구 중 다양한 시점의 소변 및 혈액 분석을 통해 모니터링 할 것이다. 회복 기간의 완료 시점에 (84 4-5일), 동물을 안락사시키고, 부검을 수행하여 신장, 도관, 및 조직학적 준비 및 병리학적 검사를 위한 관련 기관 및 조직을 수거할 것이다. 20마리의 동물 중 4마리에 2가지 주요 절차를 수행할 것이다. 제1 절차는 방광 생검일 것이다. 이 후 제2 외과적 절차를 수행하여 자가 방광 SMC로 시딩된 네오-요로관 구조물을 이식할 것이다. 나머지 16마리의 동물에는 하나의 부수적인 외과적 절차를 수행하여 복부 및 정맥 채혈로부터 지방 조직을 수집할 것이다. 상기 조직을 세포 시딩된 네오-요로관 구조물을 구축하는 데 사용되는 자가 세포를 수거하는 데 사용할 것이다. 상기 절차는 구조물에 필요한 충분한 자가 조직 샘플에 대해 요구된다. 2개의 조직을 16마리의 동물로부터 수집하여 최적화된 방법을 군 선택에 제공할 것이다. 상기 동일한 동물에 혈액 또는 지방 조직으로부터 유래된 자가 SMC 시딩된 지지체를 이식할 것이다. 도관 임플란트에 대한 혈관 공급원으로서 복막의 사용을 또한 평가할 것이다.

[0694] 시험 동물: 일반명: 요크셔(Yorkshire) 돼지; 품종/분류: 수스 스크로파(Sus Scrofa); 동물 수 (성별): 암컷 10마리 및 수컷 10마리; 체중 범위: 25 ± 5 Kg.

[0695] 처리 군: 상기 연구의 목적은 12주의 시간에 걸쳐 암컷 및 수컷 요크셔 돼지 모델에서의 텐젼의 네오-요로관 구조물을 평가하는 것이다. 표 9.1은 본 연구의 5 단계를 나타낸다.

[0696] [표 9.1]

[0697]

| 요약 | |
|---|---|
| 단계 A | 기저시점 데이터 수집, 지지체용 평활근 세포를 위한 조직 수거 |
| 단계 B | 후원자에 의한 시험품 (구조물)의 생성 |
| 단계 C | 20마리 동물의 외과적 이식 절차 |
| 단계 D | 생존: 수술후 처치 및 모니터링, 관찰, 데이터 수집 |
| 단계 E | 부검전 추적 조사, 및 조직 수거 및 조직 구조를 이용한 부검 |

[0698] 표 9.2는 본 연구 설계의 요약을 제공한다. 체중은 생검전, 수술전 및 부검전에 측정될 것이다. 절개 부위의 평가는 14일 동안 또는 치유될 때까지 매일 이루어질 것이다. 스토마 버튼의 보수는 필요한 경우 연구 기간 동안 매일 할 것이다. 괴사조직 제거는 동물마다 필요한 만큼 수행할 것이다.

[0699] [표 9.2]

| 군 번호 | 처리 | 동물의 수<br>M F | 생검 절차 | 외과적 절차 (제 0 일) | 수술후 절차 | 예정된 부검 시점 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 자가 방광 SMC | 2 2 | 각 동물로부터 수집함:<br>2.5 $cm^2$ 조직 샘플 | • | 완전한 방광 적출술 후, 수뇨관을 NUC 구조물의 유입 말단에 부착되도록 전위시킴 | |
| 2 | 자가 지방 SMC | 4 4 | 각 동물로부터 수집함:<br>25-50 g의 지방 조직 샘플<br>8 x 10 ml 튜브의 말초 혈액 | • 완전한 방광 적출술 후, 수뇨관을 NUC 구조물의 유입 말단에 부착되도록 전위시킴<br>• 약 7 일 동안 수뇨관에 스텐트 삽입<br>• 복막을 사용하여 구조물 전체를 랩핑 및 피복함<br>• 구조물의 배수 유출 말단을 복벽 및 출구를 통해 비실금형 스토마 없이 피부에 부착시킴 | 임상 건강 평가, 체중, 스토마 버튼 및 절개 부위 보수, 혈액 및 소변 검사, 신우조영술 및 초음파 | 이식 후 대략 3 개월 (이식으로부터 84 ±5 일) |
| 3 | 자가 혈액 SMC | 4 4 | | • 개방성을 유지하기 위해 스토마 버튼을 영구 위치시킴 | | |

[0700]

[0701] 시험 장치.

[0702] 시험품 군 1: 자가 방광-유래 SMC를 갖는 PGA/PLGA 네오-요로관 구조물. 기재 사항: 합성 락티드/코글리콜라이드 산 중합체 + 자가 방광 유래 SMC로 이루어진 지지체.

[0703] 시험품 군 2: 자가 지방-유래 SMC를 갖는 PGA/PLGA 네오-요로관 구조물. 기재 사항: 합성 락티드/코글리콜라이드 산 중합체 + 자가 지방 유래 SMC로 이루어진 지지체.

[0704] 시험품 군 3: 자가 혈액-유래 SMC를 갖는 PGA/PLGA 네오-요로관 구조물. 기재 사항: 합성 락티드/코글리콜라이드 산 중합체 + 자가 혈액 유래 SMC로 이루어진 지지체.

[0705] 체중:

[0706] 절차 기재사항: 눈금 저울 상에서 동물의 체중 측정을 수행할 것이다.

[0707] 상기 절차의 기간/빈도: 생검전; 수술전 및 부검전. 수의사의 재량에 따라 추가로 체중을 잴 수 있다.

[0708] 절차 수행: 숙련된 기술자에 의해 체중 측정을 수행할 것이다.

[0709] 진정/마취:

[0710] 절차 기재사항: 생검 및 시험 장치 이식 절차: 수술 준비 전에 각 동물을 진정시킨 후, 마취할 것이다.

[0711] 수술 준비:

[0712] 절차 기재사항: (생검 및 이식 당일) 모든 동물에 대해, 치골 결합에 대한 검상 돌기 상부 모발을 3 인치로 자를 것이다. 이어서, 상기 동물을 양와위로 위치시킬 것이다. 이어서, 수술 부위를 포비돈-요오드 용액 및 70% 알콜의 3회 교대 세척로 세정하고; 교대 세척이 완료된 후, 포피돈-요오드 용액을 최종적으로 사용하고, 건조시킬 것이다. 상기 부위는 패혈증 수술을 위해 드레이핑될 것이다.

[0713] 절차의 기간/빈도: 생검전 및 수술전. 수술 준비는 각 사건 당 대략 30분이 요구될 것이다.

[0714] 요 샘플 수집 및 분석:

[0715] 절차 기재사항: 생검전 및 부검전에 2개의 소변 샘플을 카테터 삽입 또는 시험 튜브 캐칭 방법으로 수집할 것이다.

[0716] 대략 3.0 정수 부피의 요 샘플 (정량 시험용으로 약 1 mL 및 정성 시험용으로 2 정수)이 정성 분석용 멸균 용기에 수집될 것이다.

[0717] 수집된 소변을 5 mL 멸균 튜브로 경사분리할 것이다.

[0718] 정성적 소변검사: 0.5 mL의 소변을 수집 당일에 분석할 것이다. 정성 측정은 멀티스틱스(Multistixe) 10 SG 시험 스트립을 사용하여 수집 시점에 수행될 것이다.

[0719] 정량적 소변검사: 1 mL 이상을 5 mL 멸균 튜브로 경사분리할 것이다. 정성 및 정량 측정 모두에서 중요한 파라미터로는 다음을 들 수 있다: 정성적 소변검사: 시험 스트립-글루코스, 빌리루빈, 케톤, 비중, 혈액, pH, 단백질, 우로빌리노겐, 아질산염 및 백혈구.

[0720] 정량적 소변검사: 정성적 양의 박테리아, 글루코스 및 총 단백질.

[0721] 절차의 기간/빈도: 절차는 동물마다 대략 15분 정도 걸린다. 수집은 생검전 및 부검전에 수행될 것이다.

[0722] 채혈.

[0723] 혈액학, 응고, 혈청 화학, 혈액 가스.

[0724] 혈액학: 혈액학적 샘플을 2.0 ml EDTA 튜브에 수집하고, 빙수 상에 보관하거나 냉장시킬 것이다 (2-8℃). 샘플을 표지할 것이며, 수집한 지 24시간 이내에 분석을 수행할 것이다. 혈액 샘플을 하기 상술한 파라미터에 대해 평가할 것이다: 총 백혈구 계수 (WBC); 적혈구 계수 (RBC); 헤모글로빈 농도 (HGB); 헤마토크리트치 (HCT) 1; 평균 혈구 용적 (MCV); 평균 혈구내 헤모글로빈 (MCH) 1; 평균 혈구내 헤모글로빈 농도 (MCHC) 1; 혈소판 계수 (PLT) (여기서, 1 = 계산치).

[0725] 응고: 총 1.8 mL의 혈액을 1.8 mL 나트륨 시트레이트 튜브 (0.2 mL의 3.8% 나트륨 시트레이트)로 수집할 것이다. 시트레이트화된 혈액 샘플을 1,000 내지 1300 x g에서 10 내지 15분 동안 원심분리할 때까지 얼음 위에서 보관할 것이다. 동결 건조하기 전에, 혈장을 1/2로 나누고, -70℃에서 동결 건조하였다. 시트레이트화된 혈장 샘플을 -70℃에서 보관하는 것이 요구된다. 샘플을 하기 파라미터에 대해 평가할 것이다: 프로트롬빈 시간 (PT); 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (APTT); 및 피브리노겐 (FIB).

[0726] 혈청 화학: 혈청 화학을 위한 샘플을 대략 4.0 ml 혈청 분리 튜브에 수집할 것이다. 상기 혈액 샘플을 원심분리하고 (10-15분 동안 1300-1600 zg), 멸균 기술을 이용하여 혈청을 추출할 것이다. 이어서, 혈청을 -70℃에서 동결건조시킬 것이다. 샘플을 하기 혈청 화학 파라미터에 대해 평가하였다: 글루코스 (GLU); 우레아 질소 (BUN); 크레아티닌 (CRE); 총 단백질 (TPR); 알부민 (ALB); 글로불린 (GLOB) 1; 알부민/글로불린 비 (A/G) 1; 칼슘 (CAL); 인 (PHOS); 나트륨 (NA); 칼륨 (K); 클로라이드 (CL); 총 콜레스테롤 (CHOL); 총 빌리루빈 (TBIL); 트리글리세리드 (TRG); 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT); 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST); 알칼리성 포스파타제 (ALK); 감마 글루타밀트랜스퍼라제 (GGT); 여기서, 1=계산치.

[0727] 혈액 가스: 혈액 가스/스펀 헤마토크리트/총 단백질 모니터링: 동맥 혈액 샘플 (약 1.0 mL)을 수집하고, 눈금형 i-STAT 분석기 및 적절한 카트리지를 사용하여 분석할 것이다. 샘플을 하기 혈액 가스 파라미터에 대해 평가할 것이다: 나트륨 (Na) (mmol/L) PCO2 (mm Hg); 칼륨 (K) (mmol/L) PO2 (mm Hg); 이온화 칼슘 (iCa) (mmol/L) TCO2 (mmol/L); 글루코스 (Glu) (mg/dL) HCO3 (mmol/L); 헤마토크리트 (Hct) (%) BEecf (mmol/L); pH; 및 SO2

(%).

[0728] 절차의 기간/빈도. CBC, 임상 화학 및 응고용 혈액 샘플의 수집을 생검전, 4주 및 8주, 및 부검전에 수행할 것이다. 혈액 가스를 생검전에 수집할 것이다. 각각의 채혈 절차는 동물마다 대략 15분 정도 걸린다.

[0729] 세포 배양을 위한 혈액 수집, 지방 조직 수집 및 방광 조직 수집:

[0730] 절차 설명: 혈액 수집 (군 2 및 군 3): 헤파린 처리된 진공채혈관 중 16 마리의 동물 (8M, 8F)로부터 수집한 정맥 혈액의 대략 8 x 10 ml 분취액. 지방 조직 수집 (군 2 및 군 3): 지방 조직 및 방광에 접근하기 위해, 배꼽 바로 뒤에서 시작하는 복부에 중앙선 절개를 수행할 것이다. 혈액을 수집하였던 동일한 16마리의 동물로부터, 피하 지방 조직을 복부에서 무균상태로 수집할 것이며, 이는 대략 25 g 내지 50 g의 조직에 상응한다. 생검 조직을 즉시 조직 배양 배지를 함유하는 용기에 무균상태로 보관할 것이다.

[0731] *방광 조직 수집 (군 1):* 남아있는 4마리의 동물에서, 방광을 노출시키고, 요를 비울 것이다. 방광 조직의 한 정점 천정부 조직 (약 2.5 X 2.5 cm)을 방광으로부터 절개할 것이다. 방광 조직을 즉시 조직 배양 배지에 무균상태로 보관할 것이다. 이어서, 방광에 있는 결함을 흡수가능한 봉합재를 사용하여 적절한 기법에 의해 봉합할 것이다.

[0732] 복부 절개를 적절한 크기의 흡수가능한 봉합재를 이용하여 층마다 봉합할 것이다. 피부를 다시 적절한 크기의 흡수가능한 봉합재를 사용하여 피하내 방식으로 봉합할 것이다.

[0733] 방광절제술시 도관을 통한 수뇨관 전위:

[0734] **절차 설명 요약:** 수뇨관 전위 절차를 개복술을 통해 수행할 것이다. 배꼽 앞쪽 5 cm에서 시작하여 뒤쪽으로 대략 15 cm 연장되는 복부에서 중앙선 절개를 수행할 것이다. 조직이 네오-요로관 구조물을 커버하기에 충분히 길어서 체벽을 통해 배출될 수 있는 도관을 형성할 때까지, 복막을 확인하여 복부 공간으로부터 주의깊게 분리할 것이다. 구조물을 감싸고 체벽 밖으로 연장될 도관을 형성하도록 복막을 측정하고 절단할 것이다. 복막을 구조물 주위에서 3-0 바이크릴로 봉합할 것이다. 조직이 무손상 및 혈관증식된 채로 남아있도록 주의할 것이다. 이어서, 방광을 노출시키고, 요가 복강 내로 들어가지 않도록 주의하면서 요를 비울 것이다. 방광에 공급되는 동맥 및 정맥을 확인하고, 결찰할 것이다. 수뇨관을 확인하고, 7Fr 14cm의 비흡수성 수뇨관 스텐트 (다빈치 제조) 2개를 상승 방식으로 삽입하고, 수뇨관을 방광으로부터 주의깊게 횡절단할 것이다. 요도를 횡절단 하자마자 휘갑칠 것이다. 이어서, 방광을 제거할 것이다. 좌측 수뇨관을, 우측편에 도달할 만큼 충분한 이동성이 존재할 때까지 앞쪽으로 연장되는 주위의 후복막 근막으로부터 주의깊게 제거할 것이다. 우측 수뇨관을 구조물의 말단에 도달하도록 자유롭게 절개할 것이다. 수뇨관을 3-0 바이크릴로 구조물 상에 단순한 연속 패턴으로 봉합할 것이다. 스토마가 유선 측면의 복벽 상에 생성될 것이다. 복막 도관을 복부에서 끄집어내어 피부에 봉합할 것이다. 수술용 접착제를 봉합선을 따라 도포하고, 여기서 복막은 체벽에서 배출된다. 스텐트에 연결된 봉합 가닥은 향후 제거 동안 스토마를 통해 복부에서 끄집어내고, 적절한 길이의 다빈치 제조 스토마 버튼/카테터를 스토마에 삽입하여 생존 기간 동안 적합한 배출을 허용하도록 할 것이다. 안정되면, 비흡수성 프롤렌 봉합사를 이용하여 복부 절개를 봉합할 것이다. 피부를 통상의 방식으로 봉합할 것이다. 이어서, 동물을 동물 우리에서 회복시킬 것이다. ***주의:*** *복막은 혈관을 통한 혈액 흐름이 멈추지 않도록 주의하면서 취급 및 조작되어야 한다.* 수뇨관의 비-분해성 스텐트는, 이들을 미리 제거해야 할 필요성 (예를 들면, 신장 폐쇄)이 진단학적 평가에 의해 드러나지 않는 한 대략 7일 동안 제자리에 남길 것이다.

[0735] 절차의 기간/빈도: 0일에 동물 당 대략 2 내지 4시간 지속, 동물 당 1회

[0736] 스토마 버튼 관리 및 유지 & 절개 부위 평가

[0737] 절차 설명:

[0738] *스토마 버튼/카테터 (폴리 또는 동등물):* 확정 수술 후, 스토마 카테터 (다빈치에서 생성된 스토마 버튼 또는 동등물: 다양한 시점에서의 필요를 기준으로 3 내지 10 cm)를 재삽입하고, 봉합사를 이용하여 동물에 고정시킬 것이다. 스토마 버튼을 연구 기간 동안 제자리에 유지시킬 것이다. 카테터가 명백히 적하하지 않을 때 그를 멸균 염수로 플러싱할 것이다. ***주의:*** 7일과 21일 사이에, 지지체 물질은 분해되고, 미립자 (단백질-관련)는 요에 분산되기 시작한다. 이는 스토마 버튼을 폐색하여 구조물 용량 초과의 요 부피를 보유하게 할 수 있다. 따라서, 필요하다면 스토마 및/또는 네오-도관의 이물질제거술을 수행할 것이다.

[0739] *절개 부위 평가:* 절개 부위를 초기 14일 동안 또는 치유될 때까지 매일 평가할 것이다. 스토마 영역 및 주위 조직을 1일 2회 세척할 것이다. 스토마를 요 배출에 대해 관찰하고, 절개 부위를 열개, 비정상적 방출, 냄새,

자극 또는 임의의 이상에 대해 평가할 것이다.

[0740] *정체된 스토마 조직 이물질제거술 절차:* 스토마/도관 내 정체된 조직을 갖는 동물에 대해 이물질제거술 절차를 수행할 것이다. 동물을 프로토콜에 따라 진정제 투약할 것이다. 스토마에 작은 절개를 만들어 이물질제거술을 위한 겸자의 삽입을 용이하게 할 수 있다. 정체된 유출물을 육안으로 확인하고, 겸자로 집어 서서히 당길 것이다. 모든 정체된 조직이 제거되면, 스토마/도관을 염수 용액으로 플러싱할 수 있다. 절개를 봉합사(들)로 봉합하고, 스토마 버튼을 재삽입하고, 봉합사를 이용하여 동물에 고정시킬 것이다. 동물을 개별 우리에서 회복시킬 것이다.

[0741] 절차의 기간/빈도: 하기와 같은 수술 절차를 따름: 스토마 버튼: 매일 관찰한 후, 카테터가 적하하지 않는 것으로 관찰될 때 필요에 따라 유지함. 시간은 대략 15분이 요구됨. 절개 부위 평가: 초기 14일 동안 또는 치유될 때까지 매일.

[0742] 임상 관찰:

[0743] 절차 설명: 회복: 각각의 수술을 완료한 직후, 동물을 마취로부터 회복시켜 사육 우리에 옮길 것이다. 4주 기간 동안 이식-후 임상 관찰: 이식후, 음식물 섭취 및 배설물 요 배출의 개별 동물 평가를 4주 동안 이식 후 주당 5일 동안 매일 (즉, 월요일부터 금요일까지) 수행할 것이다. 관찰 기간은 기관 수의사 및/또는 연구 감독자의 판단으로 연장할 수 있다. 생존: 이식/재이식 수술 후 회복 동물은 84 +/- 5일의 기간 동안 생존할 것이다.

[0744] 절차의 기간/빈도: 회복: 임의의 수술 절차의 말기에 대략 1시간 수행할 것이다. 이식/재이식 수술 후 5일 동안 임상 관찰: 임상 관찰은 주 당 5일 동안 매일 수행할 것이다.

[0745] 매일 동물 건강 평가: 검역에서부터 부검까지의 연구 기간 동안 대략 10분 간격으로 대략 8시간 1일 2회 수행할 것이다.

[0746] 신우조영술 및 초음파:

[0747] 절차 설명:

[0748] 신우조영술을 말초 정맥을 통해 수행하거나, 또는 별법으로 신장 동맥에 직접 조영제를 주입하여 형광투시법 하의 대퇴 동맥 카테터삽입을 통해 수행할 것이다. 초음파는 신장 및 네오-요로관에 대해 전신 마취 하에 수행할 것이다.

[0749] 절차의 기간/빈도:

[0750] 신우조영술: 사전-부검. 절차를 동물 당 대략 30분 지속한다. 초음파: 사전-생검 (신장), 4주, 8주 및 사전-부검 (신장 및 네오-요로관). 연구 감독자 및 주치의인 수의자의 판단으로, 동물의 임상 건강을 평가하기 위한 필요에 따라 다른 시점에서 추가의 초음파 영상화를 수득할 수 있다.

[0751] 동물 희생 및 부검.

[0752] 절차 설명:

[0753] 예정외의 부검 - 죽거나 죽어가는 것으로 발견되거나 예정외의 안락사가 진행중인 임의의 동물을 제한된 부검에 제공할 것이다. 시험적 부검은 임의의 잠재적인 사망 원인(들) 또는 안락사를 유도하는 문제점을 결정하려고 시도할 것이다. 조직 수집은 비뇨생식계통으로 제한될 것이다. 예정외 및 예정된 안락사 - 모든 동물에게 나트륨 펜토바르비탈 (150 mg/kg, IV)을 주입하여 안락사를 유발시킬 것이다. 예정된 안락사는 이식후 12주 (84 ±5일)에 일어날 것이다.

[0754] 신체 검사 - 모든 동물을 안락사 전에 기관 수의사에 의해 평가할 것이다. 검사는 동물의 일반적인 상태, 즉 직장 체온, 호흡 속도, 심박수 및 모세혈관 재충전 시간의 기록을 포함할 것이다. 부검 - 모든 동물을 부검할 것이다. 신장, 도관, 수뇨관, 수뇨관-방광 접합부, 중앙도관, 도관-피부 접합부 및 림프절 (요추 및 장간막)에 대한 특정 초점이 존재할 것이다. 신장, 수뇨관, 요도 (존재한다면), 도관, 스토마, 흉부, 복부 및 골반 강 및 이들의 기관 및 조직에 대한 총 평가를 수행할 것이다. 임의의 총 병변, 유착 및/또는 기관 변화 (재생 포함)가 관찰된다면, 이들을 조직병리학적 평가를 위해 조사하고, 사진찍고, 수집할 것이다. 복부강의 주요 기관을 향후 가능한 현미경 분석을 위해 수집하고, 비축할 것이다. 주요 기관은 간, 비장, 췌장, 대장 (맹장, 결장, 및 직장), 소장 (십이지장, 공장 및 회장) 및 위 (분문, 위저부 및 유문)이다. 완전한 네오-요로관 영역을 가시화하고, 그 자리에서 사진찍을 것이다. 추가의 사진 및/또는 총 병변을 부검자의 판단으로 찍을 수 있다.

도관의 고정은 포르말린을 이용하여 포르말린을 스토마에 주입하고 도관 및 수뇨관을 팽창시킴으로써 수행할 것이다. 이는 스토마를 묶어 압력을 유지시키면서 폴리 (또는 동등물) 카테터를 이용하여 수행할 것이다. 84일 (±5일)에 동물 당 대략 1/2시간의 단일 사건 기간.

[0755] 조학/병리학 실험실

[0756] 절차 설명: 고정된 비뇨 기관 (즉, 이식된 신도관, 신장 및 관련 조직)을 수집하고, 손질하고, 검사하고, 파라핀에 삽입하고, 절단할 것이다. 슬라이드를 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 및 마손 3색 (엘라스틴)으로 염색할 것이다.

[0757] 실시예 10 - 상피화 점막을 갖는 도관의 형성

[0758] 상기 실시예 9 프로토콜에 따라, 지방-, 말초 혈액- 또는 방광-유래된 평활근 세포로 시딩된 NUC 지지체를 동물에 이식하였다.

[0759] 수술-후 임상 관찰은 세개의 처리군 모두에 걸쳐 유사하였다. 모든 군의 모든 동물은 수술-후 절차 직후에 요가 스토마로부터 흘렀다. 모든 군의 모든 동물은 1개월까지 임상적으로 정상이었다. 모든 군의 모든 동물은 스토마 버튼 유지를 필요로 하였고, 스토마로부터의 요 흐름을 유지하기 위한 이물질제거술을 필요로 하였다. 신장 기능의 혈청 마커 (혈액 우레아 질소 [BUN] 및 혈청 크레아티닌)는 모든 처리군에 걸쳐 기준에서 유사하였다. 4주째에, 모든 군에 대한 값이 증가하였다 (데이터는 나타내지 않음). 염증의 혈액학 지시자 및/또는 안전 관심사 (전체 백혈구 및 피브리노겐)는 모든 처리군에 걸쳐 기준에서 유사하였다. 4주째에, 모든 동물에 대한 값이 증가하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0760] 부검 후, 고정된 비뇨 기관 (즉, 이식된 신도관, 신장 및 관련 조직)을 수집하고, 손질하고, 검사하고, 파라핀에 삽입하고, 절단하였다. 슬라이드를 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 및 마손 3색 (엘라스틴)으로 염색하였다. 동물에 형성된 도관을 검사하였고, 스토마 말단에서 상피화 점막을 특징으로 하는 것으로 발견되었다. 도 74에 도시된 바와 같이, 상피화 점막은 스토마 말단 (지방-유래된 SMC로 시딩된 네오-요로관)에 위치한다. AE-1/AE-3을 사용하여 상피의 지시자로서 시토케라틴 마커를 검출하였다.

[0761] 실시예 11 - 삼각-보존 방광절제술 후 네오-방광 증대 구조물

[0762] 본 연구의 네오-방광 구조물은 대상체 자신의 기관 특이적 세포가 성장하는 생분해성 지지체로부터 형성될 것이다. 목표는 질환이 있는 방광 대신에 이식될 수 있는, 대상체를 위한 신규한 방광을 구축하여, "배설강" 생성에 대한 필요를 경감시키는 것이다. 본 연구의 목적은 방광 증대를 위한 네오-방광 구조물의 동등성을 결정하는 것이다.

[0763] 실험 설계. 개 6군 각각은 3마리의 암컷 및 3마리의 수컷을 포함할 것이며, 이들에서 요로상피 세포 (UC) 및 평활근 세포 (SMC)의 상이한 밀도를 시험하게 할 것이다. 방광 증대 지지체는 하기와 같이 세포로 시딩될 것이다.

[0764]

| 군 | 설명 | 세포 공급원 |
|---|---|---|
| 1 | $10 \times 10^6$ UC 및 $10 \times 10^6$ SMC | 방광 |
| 2 | $0.1 \times 10^6$ UC 및 $20 \times 10^6$ SMC | 방광 |
| 3 | $0.01 \times 10^6$ UC 및 $20 \times 10^6$ SMC | 방광 |
| 4 | 0 UC 및 $20 \times 10^6$ SMC | 방광 |
| 5 | 0 UC 및 $20 \times 10^6$ SMC | 혈액 |
| 6 | 0 UC 및 $20 \times 10^6$ SMC | 지방 조직 |

[0765] 조직 생검 절차. 군 1 내지 군 4는 방광 생검으로부터 유래된 SMC 및 UC를 사용한다. 방광 생검 절차를 위해 동물을 마취시키는 날 이전에 또는 마취시키는 동안에, 말초 혈관으로부터의 무균 혈액 수집을 위해 각각의 동물을 준비하고, 대략 60 mL의 정맥 혈액을 무균상태로 수집할 것이다 (나트륨 헤라핀을 함유하는 6개의 10 mL 혈액 튜브). 복부에 방광 생검을 위한 중앙선 절개가 이루어지면, 지방 조직이 노출되고, 절단될 것이다. 복

부에서 무균상태로 수집된 지방 조직의 양은 조직의 대략 20 g 내지 50 g에 상응할 것이다. 수집된 조직의 양이 충분하지 않다고 결정된다면, 서혜부 지방 패드 위에 절개를 가하고, 피하 조직을 절단하여 지방 조직을 얻을 것이다. 방광을 노출시키고, 방광에서 요 (존재하는 경우)를 비울 것이다. 이어서, 대략 2 cm × 1 cm의 방광 한 조각을 방광의 정점으로부터 절단할 것이다.

[0766] 수술 절차 (1일) - 삼각-보존 방광절제술을 수행한 후, 네오-방광 구조물을 이식하였다. 수술후 절차 - 사이클링, 순응도 측정, 형광투시경 검사, 일반적인 건강 평가, 및 임상 처리를 필요에 따라 수행한다. 부검 시점 - 이식 후 대략 6개월 (이식 후 182±2일).

[0767] 동물. 캐니스 패밀리어리스(*Canis familiaris*) 종 (종족 - 몬그렐 도그)를 사용한다. 12마리의 수컷 (추가로 1마리의 대체물)을 사용한다. 분만 및 임신한 적이 없는 12마리의 암컷 (추가로 1마리의 대체물)을 사용한다. 동물은 생검 단계에서 어린 성체이며, 체중이 15 kg 내지 25 kg이다.

[0768] 동물 준비. 생검 수술시에, 방광에 이중 관강 카테터 (또는 동등물)를 삽입하여 기준 순응도 측정치를 얻을 것이다. 측정 후 동물로부터 카테터를 제거할 것이다. 확정 수술시에, 방광에 폴리 카테터를 삽입할 것이다. 두 절차 전에, 수술 부위를 다시 포비돈-요오드 스크럽 용액으로 철저히 세척하고, 70% 이소프로필 알콜에 적신 스폰지로 닦은 다음, 건조시킬 것이다. 듀라프렙(DuraPrep)™ (또는 유사) 용액을 상기 영역에 적용하고, 또한 건조시킬 것이다. 이어서, 상기 영역을 엄격한 무균 수술을 위해 적절히 덮을 것이다.

[0769] 수술 절차

[0770] 방광 생검. 배꼽 바로 뒤에서 시작하는 복부에 중앙선 절개를 수행할 것이다. 방광을 노출시키고, 방광에서 요 (존재하는 경우)를 비울 것이다. 이어서, 대략 2 cm × 1 cm의 방광 한 조각을 방광의 정점으로부터 절단할 것이다. 방광 조직을 조직 배양 배지 (DMEM 또는 동등물)에 보존할 것이다. 방광 내의 결함은 흡수가능한 봉합재 (PDS 또는 동등물)를 사용하여 적어도 2층마다 봉합할 것이다. 별법으로, 방광을 수술용 스테이플로 봉합하고, 봉합사 (PDS 또는 동등물)로 휘갑칠것이다. 복부 절개를 적절한 크기의 흡수가능한 봉합재로 층마다 봉합할 것이다. 피부를 다시 적절한 크기의 흡수가능한 봉합재를 사용하여 피하내 방식으로 봉합할 것이다. 별법으로, 피부를 스테이플로 봉합할 수 있다.

[0771] 네오-방광 증대 구조물 이식. 네오-방광 증대 지지체를 상기 기재한 바와 같은 UC 및/또는 SMC로 시딩하여 이식을 위한 네오-방광 증대 구조물을 형성한다. 배꼽 바로 뒤에서 시작하는 복부에 중앙선 절개를 수행할 것이다. 자가-보유 복부 견인기를 넣어 절개부를 개방할 수 있다. 방광을 노출시키고, 방광에서 요 (존재하는 경우)를 비울 것이다. 삼각 영역을 확인하고, 방광을 전체로 절제하되, 삼각 영역 및 수뇨관 밸브는 손상되지 않은 채로 남길 것이다. 이어서, 카테터를 삼각 영역 내 점막하/장막하 터널을 통과시킴으로써 구조물의 관강인 곳으로 진입시킬 것이다. 이어서, 상기 카테터를 적절한 봉합재를 이용하여 방광 장막에 고정시키고, 배꼽 주위에서 나오는 복부 근육조직, 피하 조직 및 피부를 통과하는 터널을 만듦으로써 동물의 외부로 가져올 것이다.

[0772] 구조물을, 폴리글락틴 910 봉합재로 실제 수술 시간에 결정된 일련의 봉합 패턴을 사용하여 정상 방광 조직에 문합시킬 것이다. 문합 부위의 측면 가장자리 (우측 및 좌측 둘 다)를 흡수가능하지 않은 봉합사로 표시하여 부검시 문합선의 확인을 도울 것이다. 장막을 방광 구조물 위로 잡아당기고, 수술용 접착제로 고정시킬 것이다.

[0773] 복부 절개부를 적절한 크기의 흡수가능한 봉합재로 층마다 봉합할 것이다. 피부를 다시 적절한 크기의 흡수가능한 봉합재를 사용하여 피하내 방식으로 봉합할 것이다. 별법으로, 피부를 스테이플로 봉합할 수 있다. 폴리 카테터를 제자리에 남기어 시험 장치를 이용한 방광 증대 절차 후의 수술후 요 수집을 용이하게 할 것이다.

[0774] 절개 부위 관찰. 수술 절개부(들)를 수술 후 감염, 염증 및 일반적 보전의 징후에 대해 적어도 14일 동안 (또는 치유될 때까지) 1일 1회 이상 관찰하고 평가할 것이다. 피부 스테이플 (사용되었다면)을 수술 후 7일 내지 21일 사이에 제거할 수 있다. 필요하다면 적절한 요법을 개시할 것이다.

[0775] 수술후 요 수집. 확정 수술 후, 요를 제거될 때까지 카테터로부터 수집할 것이다.

[0776] 유치 요도 카테터 (즉, 폴리)를 배치 대략 7일 이내에 제거할 수 있다. 치골상부/장막하/경피 카테터를 수술 후 대략 14일 내지 21일에 제거할 것이다. 폴리 및 치골상부 카테터가 제거되면, 요를 카테터삽입 또는 "팬 코트(pan caught)" 방법에 의해 수집할 수 있다.

[0777] 순응도 측정. 이식 후 대략 30±3일에 시작하는 매월 생검 절차 전, 및 부검일에, 순응도 측정치를 수득할 것이다. 방광에 이중-관강 카테터를 삽입할 것이다. 모든 잔류 요를 제거하고, 카테터 크기 및 배치 길이를 기

록하여 추후 절차에 대한 일관성을 보장할 것이다. 한 관강은 직접 압력 케이블에 연결하고, 다른 관강은 멸균 염수 (인큐베이터에 의해 가온됨)를 10-25 mL/분의 속도로 주입하는데 사용할 것이다. 0-10 mmHg의 출발 압력을 달성하고, 출발 시간에 따라 기록할 것이다. 시간, 전달된 부피 및 수득된 압력은, 카테터 주위에서 누출이 관찰된 시간 (aka 누출점)에서 기록할 것이다. 이어서, 주입된 전량의 염수를 흡출하여 방광을 비우고 (사이클링 또는 형광투시경 영상화가 뒤따르는지에 따라 완전히 또는 부분적으로), 회수된 부피를 기록할 것이다. 동물을 섹션 13.7에 요약된 바와 같이 진정시킬 것이다. 누출 압력 0을 얻는다면, 적어도 1회, 그러나 3회 이하로 측정을 반복할 것이다.

[0778] 사이클링. 사이클링을 2주마다 (14±2일 간격으로) 이식 후 대략 1개월에 시작하여 대략 90일까지 계속 수행할 것이다. 순응도 측정 후 및 형광투시경 영상화 전에 사이클링을 완료할 것이다. 사이클링은 순응도 측정을 완료한 후에 방광을 멸균 염수 (인큐베이터에 의해 가온됨)로 10-25 mL/분의 속도로 재-팽창시킴으로써 수행할 것이다. 사이클링을 적어도 5-10회 반복할 것이다. 0-10 mmHg의 출발 압력을 달성하고, 출발 시간에 따라 기록할 것이다. 시간, 전달된 등장성 용액의 부피 및 수득된 압력은, 카테터 주위에서 누출이 관찰된 시간 (aka 누출점) 또는 전달된 부피가 수행된 순응도 측정의 부피와 동일한 때 중 빠른 시점에 기록할 것이다.

[0779] 형광투시경 영상화. 형광투시경 영상화는 이식 후 대략 30±3일에 시작하여 매월 1회 및 부검일에 수행할 것이다. 형광투시경 영상화는 조영제 매질을 방광에 주입하고 그를 기록함으로써 수행할 것이다. 형광투시경 영상화는 순응도 측정 또는 사이클링의 완료 후에 (시점에 적절하게) 수행할 것이다. 주입된 전체 염수의 대략 절반을 흡출하고, 멸균 염수 (인큐베이터에 의해 가온됨)와 조영제 매질의 50/50 혼합물로 대체하여 방광의 가장 최근 누출 부피를 팽창시킬 것이다. 형광투시경 영상화는 50/50 혼합물의 주입 전체에 걸쳐 수행할 것이다. 방광조영술에 사용된 부피는 누출점 압력이 수득되었을 때의 부피일 것이다.

[0780] 생존중 관찰 및 측정.

[0781] 빈사율/사망률 체크. 빈사율/사망률 체크를 1일 2회 (오전 및 오후) 수행할 것이다. 모든 동물을 일반적인 건강, 사망률 및 빈사율에 대해 체크할 것이다.

[0782] 임상 관찰. 생검 절차 후, 임상 관찰을 1주에 1회 이상 수행할 것이다. 이식 후, 임상 관찰을 첫 2주 동안은 1일 2회 이상 (6시간 이상의 간격으로) 수행하고, 30일까지는 매일 수행할 것이다. 이후 임상 관찰을 1주에 1회 이상 (7±1일) 계속할 것이다. 모든 동물을 관찰하고, 관찰을 기록할 것이다.

[0783] 체중. 체중은 동물 배정 전, 생검 절차 전 5일 이내, 이식 전 5일 이내, 이후 첫 3개월 동안 (즉, 90일 까지) 매주 (7±1일), 이어서 부검까지 매월 (30±2일 간격) 기록할 것이다.

[0784] 신체 검사. 일반적인 상태, 직장 체온, 호흡 속도, 심박수 및 모세혈관 재충전 시간의 기록을 포함하는 신체 검사는, 본 연구에 들어가기 전 및 부검 전에 각각의 동물에 대해 수행할 것이다.

[0785] 병용 요법. 승인된 수의학 규정에 따라, 동물의 일반적으로 양호한 건강을 유지하는데 필요한 만큼 병용 요법 (예컨대 항생제 또는 유체 요법)을 동물에게 투여할 수 있다. 병용 요법은 필요에 따라 투여할 것이다.

[0786] 샘플 수집.

[0787] 혈액. 혈액은 말초 혈관으로부터 수집할 것이다. 혈액 부피는 전체 혈액을 나타내며, 대략적인 양이다. 하기 혈액 샘플 수집 스케쥴에 따를 것이다.

[0788]

| 시점 | 혈액학 | 혈청 화학 | 응집 |
|---|---|---|---|
| 생검 및 이식 전 (1일 전) | X | X | X |
| 이식 후 첫달 동안은 매주 1회 (7±1일 간격), 이후 매2주 (14±2일 간격), 및 부검일 | X | X | X |
| 전체 혈액 부피 | 0.75 mL | 1.1 mL | 1.3 mL |
| 항응고제 | EDTA | 없음 | 나트륨 시트레이트 |

[0789] 요. 요 샘플을 폴리 카테터 (유치 동안)를 통해 폴리 카테터가 제거된 후의 카테터삽입 또는 "팬 코트" 방법에 의해 수집할 것이다. 수집 후, 샘플을 처리 및 분석을 위한 적절한 실험실에 옮길 것이다. 하기 요 샘플 수집 스케쥴에 따를 것이다.

[0790]

| 시점 | 요 |
|---|---|
| 생검 전 및 이식 (1일) 전 | X |
| 이식 후 첫달 동안은 매주 1회 (7±1일 간격), 이후 매2주 (14±2일 간격), 및 부검일 | X |
| 요 부피 | 3.0 mL |
| 항응고제 | 없음 |

[0791] 임상 병리학

[0792] 혈액학. 혈액 샘플을 하기 파라미터에 대해 평가할 것이다. 적혈구 계수; 헤모글로빈 농도; 적혈구용적률; 평균 적혈구 부피; 평균 적혈구 헤모글로빈 농도; 평균 적혈구 헤모글로빈; 망상적혈구 계수; 적혈구 세포 형태; 혈소판 계수; 혈소판 형태; 백혈구 계수; 호중구 계수; 림프구 계수; 단핵구 계수; 호산구 계수; 호염기구 계수; 다른 세포 (적절한 경우)

[0793] 응집. 혈액 샘플을 원심분리하고, 혈장을 추출하고, 혈장 샘플을 하기 파라미터에 대해 평가할 것이다: 응집 파라미터; 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간; 프로트롬빈 시간; 피브리노겐.

[0794] 혈청 화학. 혈액 샘플을 원심분리하고, 혈청을 추출하고, 혈청 샘플을 하기 파라미터에 대해 평가할 것이다: 혈청 화학 파라미터; 알라닌 아미노트랜스퍼라제; 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제; 알칼리성 포스파타제; 감마-글루타밀트랜스퍼라제; 전체 빌리루빈; 혈액 우레아 질소 (BUN); 크레아티닌; 칼슘; 인; 전체 단백질; 알부민; 글로불린; 알부민/글로불린 비율; 글루코스; 콜레스테롤; 트리글리세리드; 나트륨; 칼륨; 클로라이드.

[0795] 요분석. 요 샘플을 하기 파라미터에 대해 평가할 것이다: 부피; 색; 투명도; 비중; 요 침전의 현미경 평가; pH, 단백질, 글루코스, 빌리루빈, 케톤, 혈액, 우로빌리노겐, 니트라이트, 백혈구를 포함하는 요 시험 스트립 분석.

[0796] 안락사. 안락사 당일에, 동물을 먼저 진정시키고, 순응도 측정 및 형광투시경 영상화를 수행할 것이다. 이어서, 안락사 (나트륨 펜토바르비탈 35-60 mg/kg을 정맥내로 심부 마취하여 효과를 나타낸 후 방혈시킴)를 수행할 것이다.

[0797] 총 부검. 완전한 총 부검을 모든 동물에 대해 수행할 것이다. 부검은 사체 및 근골격계, 모든 외부 표면 및 구멍, 뇌강 및 뇌의 외부 표면, 및 모든 흉부, 복부 및 골반 강과 이들과 관련된 기관 및 조직의 검사를 포함할 것이다. 방광에 대한 특정 초점이 존재할 것이다.

[0798] 조직 수집 및 보존. 복부 강을 개방하고, 증대된 방광을 가시화하여 그 자리에서 사진찍을 것이다. 이어서, 완전한 방광 (삼각, 문합 부위 및 네오-방광)을 제거하고, 수뇨관을 결찰하고, 요도에 적절하게 카테터삽입하여, 순응도 측정 동안 생성된 압력과 유사한 압력 하에서 평가 방법 (조직병리학)에 적절한 고정액 (즉, 10% 중성 완충 포르말린 [NBF])을 이용하여 카테터가 고정되도록 할 것이다. 21시간 내지 48시간 동안 10% NBF 중에 고정시킨 후, 조직을 70% 에탄올에 옮길 것이다. 또한, 하기 나열된 기관 (또는 기관 샘플) 및 조직을 그 자리에서 검사하고, 자유롭게 절단하고, 10% NBF 또는 다른 적합한 고정액 중에 고정시킬 것이다.

[0799] 하기 조직을 수집할 것이다: 부신 (쌍을 이룬 것); 동물 확인 (계속 확인하기 위해 부검에서 수집); 대동맥; 골수; 흉골; 뇌 (대뇌, 소뇌, 뇌간); 경부; 부고환 (쌍을 이룬 것); 식도; 눈 (쌍을 이룬 것) (데이비드슨 (Davidson) 용액 중에 고정); 담낭; 심장; 소장, 맹장; 소장, 결장; 소장, 십이지장; 소장, 회장 (파이어스 패치(Peyer's patch)를 갖는 것); 소장, 공장; 소장, 직장; 신장 (쌍을 이룬 것); 눈물샘 (쌍을 이룬 것); 간; 폐; 림프절, 하악골; 림프절, 장간막; 림프절, 장골; 유선; 신경, 눈 (쌍을 이룬 것) (데이비드슨 용액 중에 고정); 신경, 좌골; 난소 (쌍을 이룬 것); 췌장; 부갑상선; 뇌하수체; 전립선; 타액선, 하악골 (쌍을 이룬 것); 골격근; 피부; 척수 (경부, 흉부, 요부); 비장; 위 (심장, 위저부, 유문); 고환 (쌍을 이룬 것) (개질된 데이비드슨 용액 중에 고정); 흉선; 갑상선 (쌍을 이룬 것); 혀; 기관; 자궁; 질; 총 병변/매스 (개질된 데이비드슨 용액 중에 고정).

[0800] 조직학. 고정된 네오-방광을 반절 절단하여 등쪽 반절 및 배쪽 반절을 생성할 것이다 (수뇨관은 등쪽 표면 상의 방광으로 도입됨). 방광을 앞쪽/뒷쪽 선을 따라 다시 반절 절단하여 4등분의 방광 조직을 생성한다. 각각의 4등분의 조직으로부터, ~0.5 cm 이하의 폭을 갖는 3개의 샘플을 수집할 것이다 (전체 두께). 확인 보조물로서, 샘플은 길이가 샘플 1 (가장 긴 것)에서 샘플 3 (가장 짧은 것)으로 감소할 것이다. 또한, 조직의 배향을 보조하기 위해, 각각의 샘플의 뒷쪽 말단의 장막/외막 부분에 작은 절개를 수행할 것이다.

[0801] 수술 계면이 뚜렷할 때, 각각의 4등분으로부터의 2개의 샘플 (즉, 샘플 1 및 2)을 본래 방광과 네오-방광의 수

술 계면에 걸쳐있는 영역으로부터 수집할 것이다. 이들 샘플은 수뇨관이 방광 내로 삽입되는 곳 (내부가 아니라 외부) 바로 위의 영역으로부터 나올 것이다. 각각의 4등분으로부터의 제3 샘플 (즉, 샘플 3)을 네오-방광 샘플을 나타내는 수술 계면의 앞쪽 영역 (수술 계면에 걸쳐있지 않을 수 있음)으로부터 수집할 것이다.

[0802] 수술 계면이 뚜렷하지 않을 때, 3개의 샘플을 뒷쪽 (즉, 삼각부)에서 앞쪽 (즉, 정점부)으로 선형 방식으로 수집할 것이다.

[0803] 전체 12개의 샘플을 각각의 증대된 방광으로부터 수집할 것이다. 조직 샘플을 손질하고, 파라핀에 삽입하고, 조직학 평가를 위해 절단할 것이다. 절단 계획과 관계없이, 각각의 4등분으로부터의 3개의 샘플을 1개의 블록에 삽입하여 방광 당 4개의 블록이 존재하도록 할 것이다. 조직 샘플은, 그들이 절단될 때 절단면이 마주보는 경우 (예컨대 상피 단독)보다는 조직의 모든 층을 통과하도록 하는 방식으로 삽입할 것이다.

[0804] 조직병리학을 위한 슬라이드를 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 및 마손 3색 (엘라스틴)으로 염색할 것이다.

[0805] 또한, 수뇨관, 요도, 신장, 대표적인 삼각 샘플 및 국소 림프절을 손질하고, 파라핀에 삽입하고, 절단할 것이다. 슬라이드를 H & E로 염색할 것이다.

[0806] 방광 벽 두께. 각각의 절단물의 벽 두께의 정량적 측정은 평가된 군-내 및 군-간 비교로 수행할 것이다. 방광 벽의 주요 구성 부분, 결합된 요로상피/고유층 (Uro/LP), 및 근육층 (TM)의 맹검 측정은, 4배 확대의 접안 마이크로미터를 사용하여 수동으로 수행하고, 십자선으로서 표시할 것이다. 이어서, 십자선을 밀리미터로 전환시키고, Uro/LP, TM 및 전체 벽의 평균 두께를 계산할 것이다. 조직학적 등급화 단계 동안 대략적인 해부 정상상태 (즉, '해부')로 해석된 상기 절단물들을 비교 분석을 위해 평가할 것이다. 이어서, 이들 측정치를 사용하여 방광의 3개 표시 영역 (즉, 삼각, 중앙 및 정점의 방광 영역)의 상대 두께를 비교할 뿐만 아니라 전체 벽 두께의 전반적인 일관성 및 그의 구성 부분의 백분율을 평가할 것이다. 모든 값은 평균의 형태로 제공될 것이다.

[0807] 통계 분석. 데이터는 동물에 의한 개별 값 및 계산된 평균 및 표준편차를 갖는 요약 값으로 제공될 것이다. 통계 분석은 체중, 혈액학, 응집 및 혈청 화학에 대해 수행할 것이다. 적절한 통계 시험을 결정하기 위해, 각각의 데이터 세트를 SAS(등록상표) 시스템을 사용하는 통계 결정 트리에 제공할 것이다. 간격 당 군 당 성별 당 최소 3마리의 동물이 통계 분석에 요구될 것이다. 데이터는 먼저, 사피로-윌크(Shapiro-Wilk) 시험을 사용하여 정규성에 대해 시험되고, 이어서 레벤(Levene) 시험에 의해 변화의 동질성에 대해 시험될 것이다. 가정을 배제하기 위해서 상기 시험에 $p \leq 0.05$ 수준의 유의성이 요구될 것이다. 두 가정이 충족된다면, 단일-인자 ANOVA가 적용될 것이며, 이때 인자로서 동물 군 배정은 $p \leq 0.05$ 수준의 유의성을 이용한다. 파라미터 ANOVA가 $p \leq 0.05$에서 유의하다면, 둔넷(Dunnett) 시험을 사용하여 0.05 수준의 유의성에서 대조군과 각각의 시험품-처리군 사이의 통계적으로 유의한 차이를 확인할 것이다. 파라미터 가정이 만족되지 않는다면, 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 비파라미터 ANOVA 절차를 사용하여 군간 차이를 평가할 것이다 ($p \leq 0.05$). 둔의 다중 비교 시험은 상기 ANOVA가 유의한 경우 적용되며, 다시 $p \leq 0.05$의 유의성 수준을 이용할 것이다.

[0808] 실시예 12 - 삼각-보존 방광절제술 후 네오-방광 증대 구조물의 생체내 이식

[0809] 상기 실시예에 기재된 바와 같은 개 대상체에 네오-방광 증대 구조물의 이식 후, 이식된 구조물을 형광투시경 영상화에 의해 검사할 뿐만 아니라 용량 및 순응도에 대해서도 검사하였다. 도 75는 4개월에서 이식된 구조물의 방광조영술을 도시한다. A는 방광-유래된 SMC로 시딩된 구조물에 상응한다. B는 혈액-유래된 SMC로 시딩된 구조물에 상응하고; C는 지방 조직-유래된 SMC로 시딩된 구조물에 상응한다. D는 본래 방광 기준에 상응한다. 도 76은 이식된 네오-방광 구조물의 (a) 용량 및 (b) 순응도를 도시한다. 모든 혈액학 및 혈청 화학은 모든 방광 군에 대해 정상 한계 내에 있는 것으로 밝혀졌다.

[0810] 5개월에서, 동물은 임상적으로 잘 지내는 것처럼 보였으며 예상대로 체중이 증가했고, 모든 혈액학 및 혈청 화학은 모든 방광 군에 대해 정상 한계 내에 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 수뇨관증/수신증은 관찰되지 않았다. 지방-유래된 SMC 군은 (i) 혈액-유래된 SMC 군보다 높은 평균 방광 용량를 갖고, (ii) 5개월에서 방광-유래된 SMC 군 (10/10, 0.01/20 및 0/20)과 유사한 것으로 나타났다. 순응도는 5개월에서 모든 군 사이에 유사하였다. 도 77은 동물의 평균 체중을 도시한다. 도 78은 동물의 평균 혈청 크레아티닌을 도시한다. 도 79는 동물에 대한 평균 BUN을 도시한다. 도 80은 동물에 대한 평균 알칼리성 포스파타제 (ALP)를 도시한다. 도 81은 동물에 대한 전체 단백질 평균을 도시한다. 도 82는 동물에 대한 백혈구 계수 (WBC) 평균을 도시한다. 도 83 (혈액) 및 도 84 (지방)는 이식된 구조물에 대한 방광조영술을 도시한다. 표 12.3은 본래 방광 대 네오-방광 지지체 구조물의 용량을 나타낸다.

[0811] [표 12.3]

[0812]

| 5월 | 본래 | 지지체 | 본래 | 지지체 | 본래 | 지지체 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | >0.50 | | >0.65 | | >0.85 | |
| 방광 10,10 (N=6) | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 4 |
| 방광 0.1,20 (N=4) | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| 방광 0.01,20 (N=6) | 6 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 |
| 방광 0,20 (N=5) | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| 혈액 0,20 (N=6) | 5 | 5 | 4 | 3 | 4 | 2 |
| 지방 0,20 (N=6) | 5 | 4 | 4 | 3 | 3 | 2 |

[0813] 실시예 13 - 전체 재생된 방광의 특성화

[0814] 도입 및 목적: 네오-방광 지속성 및 기능 및 PLGA-기재 생분해성 중합체 지지체 상에 시딩된 전체 수의 평활근 세포 (SMC)의 효과를 개에서 근치적 방광절제술 및 자가 네오-방광 대체 구조물 (NBR)의 임플란트 후에 평가하였다.

[0815] 방법: NBR을 세가지 밀도, 즉 25, 12, 및 4 x $10^6$ 세포/구조물 (n= 8/grp)에서 SMC로 시딩하였다. 근치적으로 방광절제된 방광이 즉시 재이식된 군 (n=8) (R)을 대조군으로서 이용하였다. 생존중 평가 (방사선투과, 요분석, 및 요역동학)를 9개월의 연구 기간 동안 수행하였다. 생체외 약리학 및 조직학 연구를 연구 종결시에 네오-방광 조직에 대해 수행하였다.

[0816] 결과: 동물은 임상적으로 건강하고, 배설을 억제할 수 있고, 이식-후 3주간 방뇨할 수 있었다. 이식-후 9개월에서, 모든 군 (NBR 및 R)은 본래 방광과 일치하는 요역동학 순응도 값 및 네오-방광 조직 조직학 (점막 및 장막 라이닝, 배뇨근, 혈관계, 및 신경 성분 포함)을 갖는 기능적 방광을 가졌다. 카르바콜 (Car) 및 페닐에프린 (PE)의 다양한 농도에 대한 수축 반응은 모든 군에서 유사하였다. 그러나, α-β-메틸렌-ATP (AA)에 대한 수축 반응은 25 x $10^6$ SMC로 시딩된 R 및 NBR 임플란트에서만 명백하였다. 전기장 자극 (EFS)에 제공된 방광 조직 스트립의 로지스틱 분석은 모든 군에 대해 유사한 $EC_{50}$ 및 기울기 인자 값을 나타냈다.

[0817] 결론: 자가 네오-방광 대체 구조물은 본래 방광과 유사한 구조적, 요역동학적 및 약리학적 특징을 가지며 수술 이식 후 9개월까지 지속가능한 전체 기관으로서의 방광을 재생할 수 있다. 비정상적 조직 발달, 면역 반응의 증거, 또는 네오-방광 재생에 대한 전신 반응의 증거는 존재하지 않았다. 약리학 및 요역동학 반응은 네오-방광 대체 구조물 당 시딩된 자가 SMC의 수와 최종 재생 결과 사이에 양성 상관관계를 시사하며, 여기서 12 x $10^6$ SMC는 조직 재생 및 요역동학 결과를 달성한 것이고, 25 x $10^6$ SMC는 R에 유사한 조직 재생, 요역동학 및 약리학 결과를 달성한 것이다.

[0818] 실시예 14 - 재생된 방광 크기의 적응적 조절

[0819] 기관 크기 및 구조를 유지하는 항상성 조절은 특정 기관, 조직, 및 체중 또는 크기 사이의 복합적 관계이다. 세포 또는 조직 손실 후 기관 크기 및 구조의 조절적 발달 또는 회복은 조직 재생 또는 기관형성 동안 관찰될 수 있다. 재생 요법에 대한 일부 목적은 구조 및 기능의 회복 및 수령체에 특이적인 적응적 조절의 확립 모두를 포함한다. 세포-시딩된 PLGA-기재 지지체가 이식된 방광절제 동물에서의 적응적 조절은, 이분 척추증으로 인한 신경원성 방광을 갖는 영아에서 텐지온(Tengion) 자가 네오-블래더 오그먼트(NEO-BLADDER AUGMENT)™ (NBA)의 단계 II 임상 시험으로부터의 초기 결과를 기준으로 한 적응적 조절과 비교하였다.

[0820] 이식-후 (p.i.) 6개월 동안 세포-시딩된 PLGA-기재 지지체가 이식된 방광절체 동물에서 네오-방광 용량 및 체중을 측정하였다. 방광절제 용량 및 배뇨 간격 (VI)을 측정하고, 연령- 및 체중-부합된 단계 II NBA 임상 시험 대상체 둘 (PT1 및 PT2)에서 기준 및 NBA 이식 후 12개월에 식 예상 방광 용량 (FPBC)을 계산하였다.

[0821] 이식된 동물은 연구 기간 동안 건강하며 배설을 억제하였고, 이식 후 6개월 정도의 체중과 일치하는 네오-방광 용량을 달성하였다. 네오-방광 조직의 조직학 및 면역조직화학은 본래 방광-유사의 구조 및 기능을 나타내었으며, 이는 방광 재생을 의미한다. PT1의 기준 용량은 FPBC의 33%였다. 이식 후 12개월에서, PT1의 용량은 기준으로부터 84% 증가하였고, FPBC의 60%를 달성하였다. PT2는 기준 및 이식 후 12개월에서 FPBC의 100% 용량을 가졌다. VI는 PT1 및 PT2 둘 다에 대해 증가하였다.

[0822] 이들 결과는 동물 및 인간에서 자가 네오-방광이 재생되었으며 수령체의 신체 크기에 적절하게 성장하였음을 입증한다. 이들 데이터는 텐지온 자가 네오-블래더 오그먼트™ 이식에 의해 유도된 네오-방광이 수령체의 필요에

생체반응한다는 결론을 지지한다.

[0823] 실시예 15 - 네오-방광 재생에서 생체역학적 자극 (사이클링)의 역할

[0824] 생체역학적 자극은 조직 재생 및 최적의 치유를 촉진하는 것으로 알려진 과정이다. 방광 재생은 자궁에서 시작하여 유아기까지 인간에서 기능적 방광의 발달에 기여하는 과정인 사이클링 (충전, 저장 및 배출)에 의해 생체역학적으로 자극된다. 선천적 손상 (즉, 이분 척추증) 또는 후천적 손상 (즉, 척수 손상)으로부터의 신경원성 방광을 갖는 환자에서 사이클링의 방해는 유의한 기능적 및 구조적 변경을 초래한다.

[0825] 세포-시딩된 PLGA-기재 지지체가 이식된 방광절제 동물에서 방광 조직 재생에 대한 사이클링의 영향을 평가하고, 그 습득을 이분 척추증으로 인한 신경원성 방관을 갖는 환자에서 텐지온 자가 네오-블래더 오그먼트™ (NBA)의 단계 II 임상 시험의 결과에 적용하였다.

[0826] 이식-후 (p.i.) 네오-방광 사이클링은 이식-후 2주의 동물에서 1주에 3일 동안 개시하였다. 세가지 사이클링 파라미터를 수집하였다: 전체 주, 시간/일, 및 전체 시간. 평균 파라미터를 기준으로 세가지 사이클링 코호트 (cohort)로부터의 요역동학 평가를 조사하였다: HIGH (10 주, >3.75 시간/일, >60 시간), LOW (10 주, <2.25 시간/일, <25 시간), 및 사이클링 없음. HIGH 코호트는 LOW 코호트보다 평균 3배 더 높은 개선된 순응도 및 용량을 갖는 네오-방광을 발달시켰다 ($p < 0.0001$). HIGH 코호트는 이식-후 6개월까지 본래 기준 용량의 90%를 달성한 반면, LOW 코호트는 단지 40%를 되찾았다. 사이클링되지 않은 (자제할 수 없는) 동물은 관형 요 조직 전환을 발달시켰다. 네오-방광 벽의 조직학은 사이클링된 방광에서 본래와 보다 유사한 조직 구조 및 세포외 매트릭스 조성물 (예를 들면, 엘라스틴)을 나타내었다. NBA를 연구하는 초기 단계 II 데이터는 수술후 사이클링에서 도전 (예를 들면 개방 방광 목, 저압 고등급 환류)을 받는 환자가 그러한 도전을 받지 않은 환자에 비해 열등한 임상 및 요역동학 결과를 가짐을 시사한다.

[0827] 초기 이식-후 사이클링은 동물 및 인간에서 자가 세포-시딩된 PLGA-기재 지지체의 이식 후 재생 치유를 촉진하는데 필수적이다. 전임상 연구로부터의 통찰은 단계 II NBA 시험으로부터의 초기 통찰과 일치하며, 방광 재생에 있어서 사이클링의 중요성을 확인한다.

[0828] 도 85에는 인간 방광 발달에서 사이클링의 역할을 나타내었다. 근육 및 탄성 섬유는 증가하는 반면 콜라겐은 감소함을 발견하였다. 괄약근 긴장의 발달은 사이클링 역학의 촉진과 유사한 용어이다 (문헌 [Wahl et al. BJU Int., 2003. 91:255]). 도 86에는 방광 용량이 나이 및 소변 배출량에 의해 증가함을 나타내었다. 소변 생성이 증가할수록 방광 용량은 증가하였다 (문헌 [Kim et al. J. Urol., 1991; 146:524]).

[0829] 도 87a-c에는 사이클링이 재생 결과에 영향을 미침을 나타내었다. 네오-방광 지지체와 크기가 유사한 2개의 개군을 시험하였고, 증가한 사이클링이 보다 높은 용량의 방광을 초래함을 발견하였다. 도 87a에는 사이클링된 네오-방광 대 사이클링되지 않은 이식된 네오-방광의 조직학적 비교를 나타내었다. 탄력 섬유가 사이클링된 방광에서 발견가능하였다. 도 87b에는 사이클링된 시간의 양을 기준으로 2개의 상이한 방광간의 용량차를 나타내었다. 도 87c에는 사이클링된 방광 대 사이클링되지 않은 방광의 방광 용량을 나타내었다.

[0830] 도 88에는 임상적 결과에 대한 사이클링의 재생-증진 효과의 전이를 나타내었다. 네오-방광 임플란트를 제공받고 사이클링을 실시할 수 있었던 인간 환자는 사이클링을 실시할 수 없었던 환자에 비해 방광 용량이 개선됨을 관찰하였다. 이는 사이클링 또는 생물역학적 자극이 재생을 증진시키고 임상적 결과를 개선하는데 중요함을 암시하였다.

[0831] 실시예 16 - 근육 상응 구조물

[0832] 3차원 (3-D) 구조물은 PGA/PLGA 펠트 물질로부터 제조하였다. 특별히, PLGA로 코팅된 PGA 펠트의 구축된 다공성 분해성 지지체를 3-D 방광-유사 형상으로 형성하였고, 세포로 시딩하였다. 도 9A-E에는 추가의 구조물을 나타내었다.

[0833] 최적의 지지체 형성을 결정하기 위해서, 7개의 상이한 지지체 구조물을 미리 형성하고 선호도를 위해 수술적으로 시험하였다. 각각의 구조물에 대한 질적 스코어를 1 내지 10 등급으로 정하였다 (1은 최소로 좋아함을 나타내며, 10은 최고로 좋아하고 선호함을 나타냄). 7개의 지지체 구조물로 이루어진 지지체 구조물을 하기 표 16.1에 약술하였다.

[0834] [표 16.1]

| 지지체 구조물 | | |
|---|---|---|
| 지지체 번호 | 지지체명 | 치수 및 특징* |
| 1 | 롤링되기 전 규칙적인 크기의 편평한 지지체 | · 타원체 10 cm 길이 x 3.7 cm 폭 (도 5a의 상부 형태 참조); 2D 표면적 29.1 $cm^2$<br>· 롤링되기 전 형태는 도 6c 및 6d에 나타냄 |
| 2 | 2 롤링되기 전 지지체의 2 | · 2개의 지지체, 제1 지지체와 동일한 길이, 각각 제1 지지체의 절반 폭, 총 동일한 표면적 (도 8d 참조)<br>· 롤링되기 전 형태 |
| 3 | 규칙적인 크기의 지지체 | · 타원체 10 cm 길이 x 3.7 cm 폭 (도 5a의 상부 형태 참조); 2D 표면적 29.1 $cm^2$ |
| 4 | 50℃에서 멸균한 지지체의 단편 | · 보다 높은 온도에서 멸균되어 보다 많이 분해되고 보다 유연함 |
| 5 | 2 규칙적인 크기의 지지체의 2 | · 2개의 지지체, 제1 지지체와 동일한 길이, 각각 제1 지지체의 절반 폭, 총 동일한 표면적 (도 8d 참조) |
| 6 | 반으로 절단한 규칙적인 크기의 지지체 | · 제1 지지체와 동일한 형상, 도 8과 유사한 방식으로 중심을 절단하고 접합함 |
| 7 | 원하는 형상으로 절단한 직사각형 시트 | · 와과의 톱 장치로서 외과의용 직사각형으로 절단함 |
| *달리 나타내지 않는 한, 모든 지지체는 30℃에서 멸균함. | | |

[0835]

[0836] 수술적 선호 시험의 결과를 하기 표 16.2에 제공하였다.

[0837] [표 16.2]

| 수술적 선호 시험 결과 | | |
|---|---|---|
| 지지체 번호 | 등급 (1-10) | 코멘트 |
| 1 | 6 | 롤링되기 전 ok는 편평하게 두기 어려울 것임 |
| 2 | 2 | 매우 강성이어서 조작하기 어려울 것임 |
| 3 | 8 | 양호한 강성도, 조작하기 용이함 |
| 4* | 8 | 양호한 강성도, 조작하기 용이함 |
| 5 | 10 | 취급이 용이함, 양호한 기억 |
| 6 | 9 | 취급이 용이함, 양호한 기억, 얇게 느껴짐 |
| 7 | 1 | 매우 강성이어서 취급이 어려움, 주름지기 쉬움 |
| *다른 지지체보다 높은 온도에서 멸균함. | | |

[0838]

[0839] 실시예 17 - 생체내

[0840] 연구 목록 - 생체내: 연구 전 절차 (생검): (-제20일) 내지 (-제30일); 연구 출발 (제0일): 대략 20 내지 30일 후 연구 전 생검; 부검 출발: 제30일 ± 3일 및 제84일 ± 3일; 예비 보고: 병리상태 보고 접수 후 2 내지 3주; 최종 보고 결과: 예비 보고의 승인 후 2주; 생체내 연구 완료: 제84일 ± 3일

[0841] 연구 동물: 관용명: 요크셔 (Yorkshire) 새끼돼지; 품종/부류: 멧돼지 (Sus Scrofa); 동물의 수 (성별에 의함): 최소 12마리의 암컷; 최소 2마리의 수컷; 나이 범위: 기록해 둠; 중량 범위: 45 kg 초과

[0842] 연구 설계: 연구 설계를 하기 표 17.1에 나타내었다 ((a): 조직 공여자 및 실시 동물 (b): 폴리(락트산-코-글리콜산)의 지지체 메쉬 + 자가 평활근 세포 (c) 소변 단독 (d) 30일 동물에 대한 부검 전 샘플 (e) 평활근 세포 = SMC).

[0843] [표 17.1]

| 연구 설계 | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 군 번호 | 동물의 수 | 시험 장치 | SMC 공급원 | 혈관 공급원 | 혈액 & 소변 수집 | 방광조영도 | 생검 | 임플란트 | 부검 |
| 1 | 2 마리의 수컷 | 공급원[a] | 이용 가능하지 않음 | 이용 가능하지 않음 | 이용가능하지 않음 | 이용가능하지 않음 | 이식전 약 20일 | 이용 가능하지 않음 | 이용가능하지 않음 |
| 2 | 2 마리의 암컷 | 구조물[b] | 방광 | 장막 | 기저시점; 처음 48시간[c], 제1주, 제2주, 제3주, 제4주[d] 및 제8주 동안 주기적으로; 부검 전 | 기저시점, Sx 후, 제4주[d] 및 제8주, 부검 전 | 이용가능하지 않음 | 제0일 | 1마리의 암컷 제30일 +/-3일<br><br>1마리의 암컷 제84일 +/-3일 |
| 3 | 2 마리의 암컷 | 구조물[b] | 방광 | 복막 | 기저시점; 처음 48시간[c], 제1주, 제2주, 제3주, 제4주[d] 및 제8주 동안 주기적으로; 부검 전 | 기저시점, Sx 후, 제4주[d] 및 제8주, 부검 전 | 이용가능하지 않음 | 제0일 | 1마리의 암컷 제30일 +/-3일<br><br>1마리의 암컷 제84일 +/-3일 |

[0844]

[0845] 시험 장치: 네오-방광 확대 구조물 w/ 방광 평활근 세포 (SMC); **개시**: 합성 락트산/글리콜산 중합체 및 자가 방광 평활근 세포를 포함하는, 상기 실시예에서 기재된 바와 같은 제1 지지체 (타원체 10 cm 길이 x 3.7 cm 폭 (도 5a의 상부 형태 참조); 29.1 $cm^2$의 2D 표면적). **표지 농도**: 구조물상에 시딩된 SMC 수를 분석증에 제공하였다. 저장 온도: 22℃ ± 5℃.

[0846] 기술 및 분석 절차

[0847] **체중**:

[0848] **절차 설명**: 동물의 중량은 교정 저울로 측정하였다.

[0849] **절차의 기간/빈도**: 기저시점, 임플란트 수술 이전, 제1달 동안 매주, 이어서 그 후에 (± 2일) 매달 및 부검 전.

[0850] 수술적 준비:

[0851] **절차 설명**: 동물을 등쪽 횡와로 위치시켰다. 멸균 요로 카테터를 서서히 방광에 삽입하였고 상기 방광은 절차의 출발 전에 소변을 비웠다.

[0852] 절차의 기간/빈도: 수술 전 단일하게 일어나는 일

[0853] **생검 (공급원 수컷 돼지 단독): 절차 설명**: 복부에 정중선으로 절개하여 방광에 접근하였다. 방광 조직을 수집하기 전에, 방광의 소변을 비웠고, 방광 조직의 단편 하나 (대략) 2 cm x 2 cm를 절개하였다.

[0854] 생검 조직은 바로 조직 배양 배지를 함유하는 병에서 무균적으로 보호하고, 이어서 일괄하였다. 추가적으로, 35 mL 초과의 정맥 또는 동맥 혈액을 수집된 혈액의 총 부피의 0.05% 헤파린으로 강화된, EtO 멸균 플라스틱 병에 무균적으로 수집하였다.

[0855] 절차의 기간/빈도: 공급원 동물당 1회, 동물당 대략 1시간 지속시킴.

[0856] 카테터 임플란트 (암컷 돼지 단독):

[0857] **절차 설명**: 유치 카테터를 경정맥 및 방광 내에 넣어 각각의 동물에서 혈액 및 소변 수집을 용이하게 하였다.

[0858] 방광 카테터삽입: 복부를 정중선 절개하여 방광에 접근하였다. 방광의 소변을 비우고 하나의 8 내지 9.5Fr 개방 내강 카테터을 삽입하고 방광에 접합하여 움직임을 방지하였다. 삽입 지점은 예상되는 배쪽 확대 부위로부터 떨어진 방광의 등쪽 측면이었다. 일단 방광을 고정시킨 다음, 카테터를 포트가 부착된 동물의 측복부에 터널링시키고 피하 주머니에 임플란트하였다.

[0859] 경정맥 카테터삽입: 우측 또는 좌측 경정맥으로 둘러싸인 영역을 면도하고 무균처리하여 준비하였다. 9.5Fr 규소 카테터을 정맥에 삽입하고 봉합에 의해 고정시켜 움직임을 방지하였다. 고정시킨 다음, 추가의 큰 다빈치 포트를 부착하고 피하 주머니에 임플란트하였다.

[0860] **절차의 기간/빈도**: 확대 수술 최소 10일 전 실시하였다. 절차는 동물당 1회, 동물당 대략 1시간 실시하였다.

[0861] **소변 샘플 수집 및 분석 (암컷 돼지 단독)**:

[0862] **절차 설명**: 2개의 소변 샘플을 카테터삽입 또는 팬 코트 (pan caught) 방법에 의해 수집하였다. 정성 분석 및 정량 분석을 위해 대략 1.0 mL 및 3.0 mL의 샘플을 각각 멸균 용기에 수집하였다. 수집된 정량적 소변을 5 mL 멸균 튜브로 따라내고, 수집의 24시간 내에 냉각시키고 이동시켰다. 수집 시간에 멀티스틱스 (Multistix)(등록상표) 10 SG 시험 조각을 사용하여 정성 측정을 수행하였다. 정성 분석 및 정량 분석 모두에 대한 관심 변수에는 글루코스, 빌리루빈, 혈액, pH, 단백질, 케톤, 우로빌리노겐, 비중, 아질산염, 박테리아 1 (정량 분석 단독), 및 백혈구가 포함되었다.

[0863] **절차의 기간/빈도**: 기저시점, 임플란트 후 및 부검 전 처음 48시간, 제1주, 제2주, 제3주, 제42주 및 제8주 동안 주기적으로. 절차는 동물당 대략 15분 지속하였다.

[0864] **방광조영도**:

[0865] **절차 설명**: 형광투시 영상화를 위해 각각의 동물의 방광을 다음과 같이 준비하였다: 멸균 개방 내강 폴리 카테터를 방광 접근 부위에 넣고; 주사기를 부착하고 소변을 끌어내어 방광을 비우고; 개방 내강 카테터를 통해 3:1의 염수:조영제를 주입하고 방광을 채우고; 형광투시 영상화를 실시하였다.

[0866] **절차의 기간/빈도**: 기저시점, 수술 후, 제42주, 제8주 및 부검 전. 절차는 동물당 대략 10 내지 30분 지속하였다.

[0867] 혈액 수집 (암컷 돼지 단독):

[0868] **혈액학, 응고, 혈청 화학 및 혈액 가스 혈액학**: 혈액학 샘플을 2.0 ml EDTA 튜브에 수집하고, 습윤 얼음상에 저장하거나 냉각시켰다 (2 내지 8℃). 샘플을 표지하고 얼음상에 일괄하였다. 수집의 24시간 내에 분석을 실시하였다. 혈액 샘플을 하기 명시된 변수에 대해 평가하였다: 총 백혈구 계산 (WBC); 적혈구 계산 (RBC); 헤모글로빈 농도 (HGB); 적혈구용적율 값 (HCT)a; 평균 적혈구 부피 (MCV); 평균 적혈구 헤모글로빈 (MCH)a; 평균 적혈구 헤모글로빈 농도 (MCHC)a; 혈소판 계산 (PLT); 망상적혈구 계산 (RTC); 백혈구 감별; a = 계산된 값.

[0869] 응고: 총 1.8 mL의 혈액을 1.8 mL 시트르산나트륨 튜브 (0.2 mL의 3.8% 시트르산나트륨)에 수집하였다. 15 분 동안 1,700 x g에서 원심분리할 때까지 시트레이트화 혈액 샘플을 얼음에 두었다. 동결시키기 전, 혈장을 반으로 나누고 -70℃로 동결시켰다. 하나의 바이알을 설계 실험실로 보내고 다른 하나는 연구가 끝날 때까지 백업 (back-up)으로서 두었다. 시트레이트화 혈장 샘플을 -70℃에서 저장하였다.

[0870] 측정된 응고 변수에는 프로트롬빈 시간 (PT); 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간 (APTT); 피브리노겐 (FIB)이 포함되었다.

[0871] 혈청 화학: 혈청 화학을 위한 샘플을 대략 4.0ml 혈청 분리 튜브에 수집하였다. 혈액 샘플을 원심분리 (10분 동안 10,000 RPM) 하고, 혈청을 멸균 기법을 사용하여 추출하였다. 혈청을 2개의 별도의 표지된 바이알에 고르게 분리하였다. 혈청을 -70℃에서 동결시켰다. 혈청 샘플을 하기 변수에 대해 평가하였다.: 글루코스 (GLU); 우레아 질소 (BUN); 크레아티닌 (CRE); 총 단백질 (TPR); 알부민 (ALB); 글로불린 (GLOB) 1; 알부민/글로불린 비 (A/G) 1; 칼슘 (CAL); 인 (PHOS); 전해질: 나트륨 (NA), 칼륨 (K), 및 클로라이드 (CL); 총 콜레스테롤 (CHOL); 총 빌리루빈 (TBIL); 트리글리세리드 (TRG); 알라닌 아미노트랜스페라제 (ALT); 아스파르테이트 아미노

트랜스페라제 (AST); 알칼리성 포스파타제 (ALK); 감마 글루타밀트랜스페라제 (GGT); 1 = 계산된 값

[0872] 혈액 가스: 혈액 가스/스펀 (Spun) 적혈구용적율/총 단백질 모니터링: 동맥 혈액 샘플 (약 1.0 mL)을 수집하고, 교정 i-STAT 분석기 및 적절한 카트리지를 사용하여 수집하고 분석하였다. 샘플을 하기 혈액 가스 변수에 대해 평가하였다: 나트륨 (Na) (mmol/L); 칼륨 (K) (mmol/L); 이온화된 칼슘 (iCa) (mmol/L); 글루코스 (Glu) (mg/dL); 적혈구용적율 (Hct) (%); pH, PCO2 (mm Hg); PO2 (mm Hg); TCO2 (mmol/L); HCO3 (mmol/L); BEecf (mmol/L); pH; 및 SO2 (%).

[0873] 혈액 샘플의 절차 수집의 기간/빈도를 다음과 같이 수행하였다: 기저시점, 제1주, 제2주, 제3주, 제4주 (30일 동물에 대한 부검 전 샘플) 및 제8주, 임플란트 후 및 부검 전. 절차는 동물당 대략 15 분 지속하였다.

[0874] 복강경 방광 확대:

[0875] **절차 설명**:

[0876] **위치정하기 및 포트 배치**: 4개의 포트 경복막 기법을 사용하여 방광 및 복강내 공간으로 복강경 접근하였다. 4개의 천자를 생성하였다: 12-mm 1급 포트를 배꼽의 약 1 cm 상부에 삽입하였다; 2개의 12-mm 2급 포트를 약 7 내지 10 cm의 측면 및 배꼽의 약 3 내지 4 cm 하부에 삽입하였다; 5-mm 치골상 포트를 삽입하고 $CO_2$를 사용하여 기복을 설정하고/하거나 장막, 복막 및 네오-방광의 조작의 복강경 취급을 용이하게 하였다. 별법으로, 베레스 (Veress) 바늘을 사용하여 배꼽 하부에 5번째 복부 천자를 실시하고, $CO_2$를 사용하여 압력이 대략 15 mm Hg에 도달할 때까지 기복을 설정하였다.

[0877] **방광 확대**: 이용하는 혈관 공급원 (즉, 장막 또는 복막)에 따라 3가지 방광 확대 기법을 실시하였다.

[0878] 복막을 사용한 방광 확대: 장력 없이 1급 12-mm 포트로의 거리를 초과할 수 있는 복막의 적합한 절편을 복벽으로부터 체내로 주의 깊게 단리시켰다. 이어서 구조물의 크기보다 큰 복막의 절편을 12-mm 포트 중 하나를 통해 외부로 보내고, 복막을 주의 깊게 퍼지게 해 구조물을 수용하였다. 이어서 시딩된 구조물을 매질로부터 제거하고, 구조물 수는 확인을 위해 동물 문서에 필적하게 하였다. 이어서 구조물을 수술적 접착제 또는 봉합제를 통해 복막에 고정시켜 복막을 전체 구조물에 겹치게 하였다. 절차 동안 멸균 주사기를 사용하여 구조물을 습윤하게 유지하고 서서히 멸균 생리학상 pH 염수를 주입하였다. 일단 구조물을 고정시킨 다음, 복막/구조물 단위를 12-mm 포트를 통해 주의 깊게 복강내 공간 내부로 보내고 방광 돔상에 종방향으로 위치시켜 방광의 배쪽 측면상의 요도 바로 상부 (수뇨관 오리피스의 반대편)에 두었다. 구조물의 한 측면을, 예를 들어 0.45 cm 수평적 치수 x 0.47 cm 수직적 치수의 적절한 크기의 스테이플을 사용하여 방광에 고정시켰다. 일단 방광에 확고히 부착시킨 다음, 구조물의 위치를 모방하여 방광에 종방향으로 절개하고 구조물을 고정시키지 않은 측면에 예리하게 절개한 방광 조직을 스테이플링하였다. 복강에 도달하는 곳으로부터 예리하게 절개한 방광 내의 잔류 소변의 양이 제한되도록 예방적인 측정을 수행하였다. 이어서 구조물과 겹치는 임의의 복막을 수술적 접착제를 사용하여 방광에 고정시켰다.

[0879] 장막을 사용한 방광 확대: 장력 없이 방광의 전체 길이에 도달할 수 있는 말단 장막의 적합한 절편을 내시경 클램프를 사용하여 서서히 붙잡고, 복강으로부터 체내로 주의 깊게 단리하였다. 장막 절편을 방광 돔상에 종방향으로 위치시켜 방광의 배쪽 측면상의 요도 바로 상부 (수뇨관 오리피스의 반대편)에 두었다. 장막 혈관의 한 측면을 수술적 접착제를 사용하여 방광 표면에 고정시켰다. 일단 장막 절편을 방광에 확고히 부착한 다음, 이어서 시딩된 구조물을 매질로부터 제거하고, 구조물 수는 확인을 위해 동물 문서에 필적하게 하였다. 구조물을 12-mm 포트를 통해 복강내 공간 내부로 주의 깊게 보내고 고정시킨 장막 선을 모방하여 방광상에 종방향으로 위치시켰다. 고정시킨 장막에 보다 가까운 구조물 측면을 적절한 크기의 스테이플을 사용하여 방광상에 종방향으로 고정시켰다. 고정시킨 구조물과 같이 동일한 선을 따라 방광에 종방향 절개를 하였다. 구조물을 고정시키지 않은 측면에 예리하게 절개한 방광 조직을 스테이플링하였다. 복강에 도달하는 곳으로부터 예리하게 절개한 방광 내의 잔류 소변의 양이 제한되도록 예방적인 측정을 수행하였다. 이어서 구조물과 겹치는 임의의 장막을 수술적 접착제를 사용하여 방광에 고정시켰다. 내강 카테터를 사용하여, 증강된 방광을 누출에 대해 조사하여 적당한 폐쇄 및 물-밀폐를 확실하게 하였다. 4개의 복강경 포트를 제거하고 이어서 복부 천자를 적절한 크기의 흡수가능한 봉합 물질로 폐쇄시켰다. 적절한 크기의 흡수가능한 봉합 물질을 사용하여 피부의 피하조직을 폐쇄시켰다.

[0880] **절차의 기간/빈도**: 제0일에 동물당 1회, 대략 5 시간 지속시킴.

[0881] 개복술을 통해 장막을 사용한 방광 확대: 장막 방광 확대 절차에 있어서 복강경검사를 개복술로 변경하였음을

상기 약술하였다. 비교 목적으로, 2개의 복막 방광 확대 절차를 하기 표 17.2에 나타낸 바와 같이 개복술로서 실시하였다.

[0882] [표 17.2]

[0883]

| 개복술 연구 설계 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| DB-새끼돼지 | 지지체 | 세포 기원 및 번호 | 조직 랩 | 임플란트 후 부검 시간 |
| 1 | 제1 지지체* | 새끼돼지 방광-유도 SMC ($10 \times 10^6$) | 장막 | 제30일 ± 2일 |
| 2 | | | 장막 | 제84일 ± 5일 |
| 3 | | | 복막 | 제30일 ± 2일 |
| 4 | | | 복막 | 제84일 ± 5일 |
| *상기 기재된 바와 같음 | | | | |

[0884] 간단히, 복부에서 바로 꼬리에서 시작하여 배꼽으로 중간선 절개를 하였다. 그물막 및 복막 (peritoneum)을 확인하고, 조직이 확장된 방광 부분을 덮기에 충분한 길이까지 복부 공간으로부터 신중하게 분리하였다. 조직이 혈관화된 것을 유지하도록 주의를 기울였다. 이어서 방광을 노출시키고, 복강으로 소변이 유입되는 것을 방지하기 위해 방광에서 신중하게 소변을 비웠다. 방광으로의 구조물의 증대가 상기 개괄한 동일 절차에 따라 이어졌다. 안전해지자마자, 적절한 크기의 흡수가능한 봉합 물질로 겹겹이 복부의 절개를 폐쇄하였다. 적절한 크기의 흡수가능한 봉합 물질을 사용하여 표피하 방식으로 피부를 폐쇄하였다.

[0885] 절차의 지속: 동물마다 1회 0일에 동물마다 약 5 시간 지속.

[0886] 동물 희생 및 부검

[0887] **절차 설명:**

[0888] 비계획적 및 계획적 안락사 - 모든 동물에 나트륨 펜토바르비탈 (150 mg/kg, IV)을 주사하여 안락사시켰다. 계획적 안락사는 생검 (수컷 돼지만) 일, 확장 절차 후 제30일 및 제84일이었다.

[0889] 부검 - 모든 암컷 동물이 부검 대상이 될 것이다. 방광에 특별히 포커스를 두었다. 전체 방광 (삼각, 문합 부위, 및 네오-방광)을 절개하여 노출시키고, 계내에서 사진을 찍은 다음, 일괄적으로 절개하고, 10% NBF에서 고정시켰다.

[0890] **절차의 지속/빈도**: 제30일 및 제84일 (±3일)에 동물마다 대략 1/2 시간의 단일 이벤트 지속.

[0891] 조직학/병리학 실험

[0892] **절차 설명:** 고정된 방광 (즉, 확장된 네오-방광)을 트리밍하여 통상의 방광 및 구조물 사이의 계면을 가로질러 분리 부분을 포함시켰다. 조직 샘플을 트리밍하고, 파라핀에 매입하고, 부분화하였다. 슬라이드는 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 및 마손 3색 (엘라스틴)으로 염색될 것이다.

[0893] **절차의 지속/빈도:** 샘플 수령 3개월 이내에 조직학 및 병리학을 수행하였다.

[0894] **결과:** 하기 표 17.3 및 17.4에 나타낸 바와같이, 이식은 체중 및 방광의 용적량에서의 연관된 증가에 의해 측정되는, 동물의 성장 능력에 영향을 주지 못했다. 도 8f는 4주에서 본 발명의 이식된 패치의 방광조영상을 나타낸다.

[0895] [표 17.3] 체중.

[0896]

| 체중(Kg) | | | |
|---|---|---|---|
| 동물 번호 | 이식 | 제 28 일 | 제 55 일 |
| 1 | 60.0 | 71.7 | -- |
| 2 | 55.9 | 67.8 | 81.6 |
| 3 | 63.1 | 71.2 | 89.7 |
| 4 | 56.8 | 68.0 | -- |

[0897] [표 17.4] 방광 용량.

| 방광 용량(mL) | | | |
|---|---|---|---|
| 동물 번호 | 이식 | 제 28 일 | 제 55 일 |
| 1 | 700 | 1200 | -- |
| 2 | 750 | 1100 | 2350 |
| 3 | 775 | 1250 | 2650 |
| 4 | 1100 | 1400 | -- |

[0898]

[0899] 도 89는 지지체의 이식을 나타낸다.

[0900] 도 90은 4주에서 이식된 패치 지지체의 방광조영상을 나타낸다.

[0901] 실시예 18 - 지방-유래 평활근 세포 대 중간엽 줄기 세포 (MSC)

[0902] 지방 조직은 제한된 중간엽 분화 포텐셜을 갖는 내피 세포, 지방세포, 평활근 세포 및 전구세포로 구성되는 이종 세포 집단을 나타낸다. 본 발명자들은 정량적 RT-PCR, 항원 발현, 단백질 핑거프린팅, 성장 동력학 및 기능적 분석을 사용하여 인간 지방으로부터 유래되는 유착, 기질 혈관 분획 (SVF)의 세포 조성을 평가하였다. 본 발명자들은 지방 SVF의 평활근 세포 구획에 대한 강화가 배지 제제에 직접적으로 의존한다는 것을 나타낸다. 이들 인간 지방-유래 평활근 세포 (Ad-SMC)는 인간 방광-유래 평활근 세포와 기능적으로 구별할 수 없고, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 다른 지방-유래 전구세포 집단과 표현형적으로 및 기능적으로 구별할 수 있다.

[0903] 본 발명자들은 정량적 실시간 PCR 방법 (탁만 (TaqMan))을 사용하여 초기 "계대 제로" 유착 인간 SVF-유래 세포 집단의 세포 조성을 조사하였다. 본 발명자들은 이 출발 유착 SVF-유래 세포 집단이 세포 발현 내피, 평활근 및 지방세포-관련 마커로 구성되어 있다는 것을 나타내었지만, 본 발명자들은 MSC의 성장에 대해 선별하는, 정의된 배지 조건 하에 SVF-유래 세포의 증식을 통해 뚜렷하게 구별할 수 있는 생물학적 특성으로 세포 집단을 확인하고 배양할 수 있었다 (문헌 [Gong et al. **Tissue Eng Part A** 2008; 15:319-330; Lund et al. **Cytotherapy** 2009;11:189-197]). 역사적으로 MSC와 관련된 마커의 분화 포텐셜 및 발현에서의 부분적 중복에도 불구하고, 이 세포 집단은 핵심 핵 및 세포 표면 마커의 발현의 FACS 및 RT-PCR (역전사 PCR) 분석을 기준으로 MSC에 비해 더 뚜렷한 평활근 세포 표현형을 갖는다. 이 집단은 또한 MSC와 비교시 내피-특이적 유전자를 현저하게 적게 발현시킨다. 평활근 세포 표현형의 징후는 계대 수, 지방 공여자 공급원 또는 재조합 사이토킨 및 성장 인자를 갖는 직접 분화에 대한 요건과 독립적이다. 추가로, 이 평활근 세포 풍부 집단은 구별할 수 있는 단백질체학적 특성을 갖고, 이는 그를 MSC와 분명하게 구별해준다. 최종적으로, 본 발명자들은 트롬복산 A2 모방 U46619에 대한 이 평활근 세포 유사 집단 및 MSC의 정반대의 대조 반응에 영향을 주어서, 두 개의 세포 유형 사이의 분명한 기능적 이분법을 기록하였다. 종합하면, 상기 데이터는 이 집단이 더 정확히 지방-유래 평활근 세포 (Ad-SMC)로서 기재되고, 지방세포, 내피 세포 및 MSC를 비롯하여 다른 클래스의 지방-유래 세포와 비교하여 분리되고 구별할 수 있는 세포 종을 나타낸다는 결론을 지지한다.

[0904] 방법 및 물질.

[0905] **지방 조직의 제조**. 인간 지방 샘플을 피하 또는 지방흡인을 통해서 얻고 (Zen-Bio, Research Triangle Park, NC), 동량의 PBS/겐타마이신 (Gibco) (5㎍/ml)으로 3 내지 5 회 세척하였다. 지방을 37℃에서 1시간 동안 여과-멸균 콜라게네이즈 I (Worthington)(DMEM-HG 중 0.1%, 1% BSA(Gibco))로 분해시킨 다음, 50ml 원추형 튜브 중 300g에서 5 분 동안 원심분리하였다. 기질 혈관 분획을 PBS/1% BSA 중 재현탁시키고, 100 ㎛ 스테리플립 (Steriflip) 진공 여과를 통해 여과하였다. 세포 집단을 300g에서 5 분 동안 다시 펠렛화시키고, DMEM-HG + 10% FBS + 겐타마이신 5 ㎍/ml 중 재현탁시켰다. 2회 계대 말기에 골수 유래 MSC를 상업적 공급자 (Lonza)로부터 얻었다. 평활근 세포 마커의 발현에서 배지 유형의 효과에 관한 연구의 경우, 별법으로 SVF-유래 세포를 α-MEM (Gibco) + 10% FBS, SMCM (ScienCell) 또는 L15 (Sigma) 중 재현탁시켰다.

[0906] **탁-만 (Taq-Man) qRT-PCR.** 제조사의 지시에 따라 알엔이지 플러스 미니 키트 (RNeasy Plus Mini Kit) (Qiagen)를 사용하여 MSC 또는 Ad-SMC로부터 RNA를 정제하였다. 제조사의 지시에 따라 슈퍼스크립트 브이아이엘오 (SuperScript VILO) cDNA 합성 키트 (Invitrogen)를 사용하여 2 ㎍의 RNA로부터 cDNA를 생성하였다. cDNA 합성에 이어서, 각각의 샘플을 1:10으로 희석하였다. 다음과 같이 하기 기재된 탁만 프라이머 및 프로브를 사용하여 qRT-PCR을 설정하였다: 10㎕ 마스터 믹스 (2X), 1 ㎕ 프라이머/프로브, 9 ㎕ cDNA (1:10 희석).

[0907] 평활근, 내피 및 지방성 유전자 발현의 평가에 다음의 탁만 프라이머를 사용하였다: SmαA (평활근 알파 액틴):

Hs00909449_m1, SM22: Hs00162558_m1, 마이오카딘: Hs00538076_m1, SMMHC (평활근 미오신 중쇄): Hs00224610_m1, 칼포닌: Hs00154543_m1, 아디포넥틴: Hs00605917_m1, FABP-4 (지방산 결합 단백질 #4): Hs1086177_m1, CDH5/VECAD (혈관 내피 캐드헤린): Hs00174344_m1, vWF (폰 빌레브란트 인자): Hs00169795_m1, PECAM1 (혈소판 내피 세포 점착 분자 #1): Hs00169777_m1, FLT1/VEGFR (VEGF 수용체): Hs01052936_m1, KDR/FLK1 (태아 간 키나제 #1): Hs00176676_m1, TEK (티로신 키나제, 내피): Hs00945155_m1. 18s rRNA를 내인성 대조군으로서 사용하고, 모든 샘플을 방광 평활근 세포 cDNA에 대해 측정하였다. 모든 프라이머/프로브를 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)로부터 획득하였다. 모든 반응을 ABI 7300 실시간 열적 싸이클러 (cycler)에서 디폴트 싸이클링 파라미터를 사용하여 수행하였다. PCR 데이터의 분석은 비교 Ct에 의해 상대적 정량 (RQ)의 방법을 사용하여 수행하였다.

[0908] **배열-RT-PCR.** 제조사의 지시에 따라 에스에이바이오사이언시스 (SABiosciences) MSC (PAHS-082A) 및 세포 표면 마커 PCR 배열 플랫폼 (PAHS-055A)을 사용하여 35회 사이클 동안 실시간 배열-기저 qRT-PCR 분석을 수행하였다.

[0909] **FACs 분석.** 2% 파라포름알데히드 중 데이터 포인트마다 0.5 x $10^6$- 1 x $10^6$ 세포를 고정하고, 비-특이적 결합을 방지하기 위해 Fc 수용체를 차단하였다. 이어서 제조사에 의해 권장된 바와 같이 세포 표면 마커 CD31, CD45, CD54, CD56, CD73, CD90, CD105, CD117 또는 CD133 (BD Biosciences)에 대해 직접 컨쥬게이션된 항체와 함께 세포를 인큐베이션하였다. 최종 세척 (PBS, 0.1% 트리톤 X-100) 후, 적절한 형광 채널을 사용하여 BD FACS 아리아 (Aria) 1 또는 구아바 이지사이트 미니 익스프레스 검정 시스템 (Guava EasyCyte Mini Express Assay system)을 이용하여 항원 검출을 수행하였다. 최소 5000 내지 10,000 이벤트를 각각의 샘플로부터 얻었다.

[0910] **2D 단백질체학적 분석.** 계대 조절 (P2의 말기) 골수 유래 MSC 및 Ad-SMC를 용균 완충제 (50mM 트리스 pH 8; 150mM NaCl; 0.5% NP40 및 프로테아제 억제제, 로슈) 중 용해시키고, 제조사의 지시에 따라 각각의 세포 유형으로부터 40㎍의 단백질 용해물을 pH 4.0-7.0 줌 (Zoom) IEF 스트립 (Invitrogen) 상에서 러닝시켰다. 이어서 각각의 스트립을 4-12% 비스/트리스 아크릴아미드 겔 상에 로딩하고, 2 차원상에서 러닝시켰다. 제조사의 지시에 따라 SYPRO 루비 (Ruby) 착색제 (Invitrogen)로 겔을 염색하였다.

[0911] 계대 조절 (P2의 말기) 골수 유래 MSC 및 Ad-SMC를 용균 완충제 (50mM 트리스 pH 8; 150mM NaCl; 0.5% NP40 및 프로테아제 억제제, 로슈) 중 용해시키고, 제조사의 지시에 따라 각각의 세포 유형으로부터 40 ㎍의 단백질 용해물을 pH 4.0-7.0 Zoom IEF 스트립 (Invitrogen) 상에서 러닝시켰다. 이어서 각각의 스트립을 4-12% 비스/트리스 아크릴아미드 겔 상에 로딩하고, 2 차원상에서 러닝시켰다. 제조사의 지시에 따라 SYPRO 루비 (Ruby) 착색제 (Invitrogen)로 겔을 염색하였다.

[0912] 결과

[0913] Ad-SVF 중 발현 마커. 본 발명자들은 플레이팅 후 초기 24 내지 48시간 내에 조직 배양 플라스크 상에 부착된 지방 조직의 기질-혈관 분획으로부터 유래되는 세포 집단의 정량적 탁만 RT-PCR 분석을 규정된 내피, 지방세포 및 평활근 세포 특이적 탁만 프라이머의 패널을 사용하여 수행하였다. 이는 초기 부착 세포 집단에서 발현마커의 분석과, 그 후에 평활근 세포 특이적 유전자의 발현시 계대, 시간 및 배지 제제의 효과의 분석을 위한 기저 수준의 수립에 이용되었다. **도 91a**에 나타낸 바와 같이, 낮지만 검출가능한 수준의 FABP-4 및 아디포넥틴이 처음 24 시간 내에 부착 세포 집단에서 관찰되었고, 이는 잔류 지방세포의 존재와 일치하였다. 유사하게, VECAD, vWF, PECAM, FLT1, FLK 및 TEK의 발현에 의해 정의되는 내피 집단은 이 시점에서 존재하였다 (**도 91d-e**). SMαA, SM22, 마이오카딘, SMMHC 및 칼포닌의 발현에 의해 정의되는 평활근 세포 집단은 또한 가장 빠른 부착 세포 집단 내에서 관찰되었다 (**도 91b-c**). 본 발명자들은 플레이팅 24 내지 48시간 내 비교 수준에서 모든 세 개의 세포 집단을 검출할 수 있었다. 하기 논의된 바와 같이, 평활근 세포는 이 세포 집단 혼합물로부터 단리되었다.

[0914] **평활근 마커의 발현은 배지 유형에 의존적이다.** 지방이 여러 세포 유형으로 구성되는 이종 조직이기 때문에, 내피 세포 또는 MSC 상의 평활근 세포에 대한 강화가 배지 제제에 의해 영향을 받을 수 있다는 예상이 합리적이다. 골수 및 지방으로부터 미분화된 MSC의 단리는 배지 조성에 상당히 의존적이다 (문헌 [Gong et al.2209 supra]). 특히, 배지 중 글루코스의 상승된 수준 또는 고밀도에서의 성장의 존재는 MSC의 증식에 대해 선별하는 ` 것으로 보인다 (문헌 [Lund et al. 2009 supra; Stolzing et al. **Rejuv Res** 2006;9:31-35]). 본 발명자들은 배지 제제의 조절이 MSC 및 다른 세포 집단을 희생하여 평활근 세포에 대한 강화에 유용할 수 있다고 추론한다. **도 92a-b (배지 유형에 따른 SMC 마커 발현의 탁만 분석)**에 나타낸 바와 같이, 지방-SVF으로부터의 평활

근 세포 강화 집단의 증식은 DMEM-HG 배지에서의 성장에 매우 의존적이다. α-MEM, SMCM 또는 L15에서의 증식은 SMαA, SM22, 마이오카딘, SMMHC 및 칼포닌의 감소되는 발현에 의해 나타나는 바와 같이 뚜렷하게 감소된 평활근 세포 표현형과 관련이 있다.

[0915] **Ad-SMC는 MSC보다 평활근 세포에 더 상당히 유사하다. 본 발명자들은** 반정량적 RT-PCR을 사용하여 Ad-SMC 및 MSC의 평활근 세포관련 유전자발현 특성을 평가한다. **도 93**에 나타난 바와 같이, 핵심 평활근 마커 칼포닌, 마이오카딘 및 SMMHC의 발현은, MSC와 비교시 Ad-SMC에서 현저하게 더 뚜렷하고, 이는 이 세포 집단이 MSC 보다 평활근 세포에 더 유사하다는 본 발명자의 가설을 지지한다. 이어서 본 발명자들은 다발성 독립적 지방 제조(n=4) 및 배양 중 5 계대에 걸친 SMC 특이적 마커의 발현 안정성을 평가하였다. **도 94 (계대에 걸친 Ads의 RT-PCR)**에 나타난 바와 같이, SMαA, SM22, SMMHC, 마이오카딘 및 칼포닌의 발현은 계대에 걸쳐 현저하게 변함이 없고, 공여자에 대해 독립적이며, 이는 평활근 세포 표현형의 발현이 시간이 흘러도 안정적이라는 것을 입증한다. 상기 관찰은 더 완전히 분화된, 표현형적으로 안정적인 세포 집단인 Ad-SMC과 일치한다.

[0916] **배열-기저 RT-PCR 분석은 Ad-SMC 및 MSC 사이에 핵심 마커의 유전자발현에서** 상당한 차이를 입증한다. 본 발명자들은 에스에이바이오사이언시스 MSC 마커 배열 패널을 사용하여 계대 조절 (P2) Ad-SMC 및 MSC 사이의 유전자 발현의 차이점을 계통적으로 확인한다. 이 패널은 MSC 전분화능 및 자가 재생과 관련되는 84개 유전자의 발현 상태를 프로파일링한다. Ad-SMC 및 MSC 사이에서 구별할 수 있는 것으로 확인되는 핵심 마커의 요약은 **표 18.1**에 나타내었다.

[0917] [표 18.1]

| 기호 | 서술 | MSC Ct | Hu Ad-SMC P4 Ct | 조절 배수 Ad-SMC 대 MSC |
|---|---|---|---|---|
| BMP6 | 골형성 단백질 6 | 34.09 | 28.57 | 35.5555 |
| CD44 | CD44 분자 (인디안 혈액 군) | 31.87 | 23.06 | 347.7725 |
| IL1B | 인터류킨 1, 베타 | 35 | 29.62 | 32.2673 |
| GDF5 | 성장 분화 인자 5 | 25.34 | 31.89 | -120.9276 |
| HGF | 간세포 성장 인자 (헤파포이에틴 A; 산란 인자) | 27.95 | 32.77 | -36.4539 |
| LIF | 백혈병 억제 인자 (콜린성 분화 인자) | 29.37 | 35 | -63.9113 |
| MCAM | 흑색종 세포 부착 분자 | 27.99 | 33.67 | -66.1652 |
| RUNX2 | 왜소 관련 전사 인자 2 | 27.69 | 30.58 | -12.1426 |
| VCAM1 | 혈관 세포 부착 분자 1 | 24.36 | 34.1 | -1103.5987 |

| 역사적으로 정의된 마커 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 기호 | 서술 | MSC Ct | Hu Ads P4 Ct | 조절 배수 MSC 대 Ads |
| ALCAM | 활성화 백혈구 세포 부착 분자 (CD166) | 24.88 | 24.44 | 1.0512 |
| ENG | 엔도글린 (CD105) | 23.06 | 22.57 | 1.0882 |
| NT5E | 5'-뉴클레오티다제, 엑토 (CD73) | 25.2 | 24.38 | 1.3679 |
| THY1 | Thy-1 세포 표면 항원 (CD90) | 29.54 | 29.68 | -1.4221 |

[0918]

[0919] MSC에 비해 Ad-SMC 중 상당한 (10배 이상) 하향-조절이 GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2 및 VCAM1에 대해 관찰되었다. MSC에 비해 Ad-SMC 중 상당한 (10배 이상) 상향-조절이 BMP6, CD44, 및 IL1β에 대해 관찰되었다. 유전자 발현에서 이러한 핵심 차이는 계대 또는 세포 샘플에 대해 독립적으로 일치하는 것으로 관찰되었다 (n=6, 데이터는 나타내지 않음).

[0920] 유전자 발현 분석을 에스에이바이오사이언시스 표면 마커 배열을 사용하여 계속하였다. 핵심 결과의 요약을 **표 18.2**에 나타내었는데, 여기서 본 발명자들은 P0 및 P4에서 Ad-SMC를 조사하였다.

[0921] [표 18.2]

| PCR 어레이 카탈로그 # PAHS-055A 인간 지방에서의 인간 세포 표면 마커 Zhu05 SQ RT 300xg DMEM | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 세포 유형 | 기호 | 서술 | Ct P0 | Ct P4 | 조절 배수 P0 내지 P4 |
| SMC | MYH9 | 미오신, 중쇄 9, 비-근육 | 23.59 | 24.2 | -2.5245 |
| | MYH10 | 미오신, 중쇄 10, 비-근육 | 25.94 | 26.05 | -1.7851 |
| | MYOCD | 미오카르딘 | 35 | 33.09 | 2.2721 |
| 내피 | ENG | 엔도글린 (오슬러-랑뒤-웨버 증후군 1) | 23.84 | 22.73 | 1.305 |
| | ICAM2 | 세포간 부착 분자 2 | 27.35 | 29.02 | -5.2634 |
| | NOS3 | 산화질소 신타아제 3 (내피 세포) | 30.01 | 31.66 | -5.191 |
| | PECAM1* | 혈소판/내피 세포 부착 분자 (CD31 항원) | 29.07 | 35 | -100.8453 |
| | SELP | 셀렉틴 P (과립 막 단백질 140kDa, 항원 CD62) | 35 | 35 | N/A |
| | TEK* | TEK 티로신 키나제, 내피 (정맥 기형, 복합성 피부 및 점막) | 31.27 | 25.68 | 29.1212 |
| | VCAM1* | 혈관 세포 부착 분자 1 | 25.88 | 34.16 | -514.1338 |
| | VWF* | 폰 빌레브란트 인자 | 27.2 | 31.49 | -32.3569 |
| 지방세포 | RETN | 레지스틴 | 35 | 35 | N/A |
| 섬유아세포 | ALCAM | 활성화 백혈구 세포 부착 분자 | 28.6 | 24.98 | 7.4333 |
| | COL1A1 | 콜라겐, 유형 I, 알파 1 | 20.26 | 20.65 | -2.1675 |
| | COL1A2 | 콜라겐, 유형 I, 알파 2 | 19.36 | 18.2 | 1.351 |
| HLA | HLA-A | 주요 조직적합성 복합체, 클래스 I, A | 24.53 | 24.7 | -1.8609 |
| | HLA-DRA* | 주요 조직적합성 복합체, 클래스 II, DR 알파 | 26.57 | 34.12 | -309.9733 |
| | CD74* | CD74 분자, 주요 조직적합성 복합체, 클래스 II 불변쇄 | 28.13 | 35 | -193.4746 |
| 기타 | NT5E | 5'-뉴클레오티다제, 엑토 (CD73) | 27.43 | 24.24 | 5.5174 |
| | NCAM1 | 신경 세포 부착 분자 1 | 35 | 35 | N/A |

* = 폴드 조절 중 변화 > |10.0|

[0922]

[0923] 섬유모세포/기질 마커 ALCAM, COL1A1 및 COL1A2의 발현은 평활근 세포 특이적 마커 MYH10, MYH9 및 MYOCD와 같이 계대에 걸쳐 유지되었다. 집단은 지방세포 마커 RETN에 대해 음성이고, 이는 부착 지방세포와 최소한의 오염을 암시한다. 중요한 것은, Ad-SMC가 4 계대 내에서 HLA MHC II 음성 상태를 획득할지라도, 이들은 처음에는 HLA MHC II 양성이며, MHC II 음성인 MSC와 핵심 구별 인자이다. 또다른 흥미있는 관찰은 내피 마커 ENG, ICAM2, NOS3, PECAM1, SELP, TEK, VECAM 및 VWF의 하향-조절에서의 일반적인 추세에 의해 판단되는 바와 같이, Ad-SMC는 계대에서 점진적으로 덜 내피적으로 된다는 것이다. 이 데이터는 **도 95**에서 RT-PCR 분석에 의해 독립적으로 확인된다.

[0924] 지방-유래 평활근 세포 (Ad-SMC) 및 중간엽 줄기 세포 (MSC) 사이의 유전자발현 프로파일을 추가로 비교하기 위해, 인간 중간엽 줄기 세포 마커 (에스에이바이오사이언시스; PCR 배열 목록 # PAHS-082A) (데이터는 나타내지 않음)에 대해 PCR-기저 유전자 배열 분석을 수행하였다. 이 결과는 Ad-SMC, MSC, 및 매우 특징적인 비-MSC 세포 유형, 인간 대동맥 내피 세포 (HuAEC) 사이의 상동의 유전자 발현의 정도를 예시하였다. 분석된 84 개의 인간 MSC 유전자 중에서, 인간 Ad-SMC는 처음의 단리에서 인간 MSC와 27%의 상동성 (84 개의 유전자 중 23 개)만을 공유한다 (데이터는 나타내지 않음). 대조적으로, 매우 특징적인 비-MSC, HuAEC는 MSC와 49%의 상동성 (84 개의 유전자 중 41 개)을 공유한다 (데이터는 나타내지 않음). 이는 Ad-SMC가 잘 알려진 비-MSC 세포 유형인 HuAEC보다 MSC와 상당히 적은 상동성을 공유한다는 결론을 지지한다. 따라서, Ad-SMC가 HuAEC보다 MSC와 훨씬 덜 유사하고, 이는 지방 조직으로부터 단리된 Ad-SMC 세포가 Ad-SMC이고 MSC가 아니라는 결론을 추가로 지지한다.

[0925] **Ad-SMC의 세포 표면 프로파일은 MSC에 대해 정의된 것과 현저히 상이하다.** 본 발명자는 MSC 및 Ad-SMC 둘다가 MSC와 전통적으로 관련된 표면 마커 CD73, CD90, CD105 및 CD166의 발현을 공유한다는 것을 밝혀냈다 (표 18.1). 그러나, 하기에 논의하는 바와 같이, 이들 마커는 이들의 MSC와의 역사적인 관련을 넘어서는 어떠한 내인성 생물학적 의미도 갖지 않는다. 세포 표면 마커 RT-PCR 분석으로부터의 유전자 발현 결과는 도 96A 내지 C (Ad-SMC) 및 도 97A 내지 B (MSC)에 나타낸 비교 FAC 분석에 일반적으로 반영되어 있으며, 여기서 Ad-SMC는 CD31+, CD45+, CD54+, CD56+, CD90+, CD105+임을 나타낸다. 중요하게도, Ad-SMC는 CD45+ 및 CD117+이며, CD45- CD117-인 MSC와는 명백하게 구별된다. CD73의 발현은 지방 기질 혈관 분획에 대한 이전 보고와 일치하지만 (문헌 [da Silva Meirelles et al. J Cell Sci., 119:2204 (2006)]), 골수 유래 MSC에 대한 보고와는 상이하다. 또한, 본 발명자는 작은 다분화능 세포 아집단을 가능한 반영하면서 CD133+ 세포의 작지만 뚜렷한 집단을 발견할 수 있었다.

[0926] **계대 제어한 MSC 및 Ad-SMC는 독특한 단백질체 시그너처를 갖는다.** 도 98은 MSC, 방광-유래 SMC, Ad-SMC 및 인간 대동맥 평활근 세포의 전체 단백질체 시그너처의 비교 분석을 나타낸다. 상단의 2개의 패널은 Ad-SMC가 MSC

와 뚜렷이 구별되며, 또한 지방 조직 뿐만 아니라 줄기 세포 및 전구 세포의 다른 클래스로부터 단리된 MSC와 명백히 상이하다는 것을 입증한다 (문헌 [Roche et al; Proteomics 2009; 9:223-232]; [Noel et al. Exp Cell Res 2008; 314:1575-1584]). 둘 모두의 겔 상의 화살표는 MSC 및 AdSMC 간의 1가지 차이; pH 구배 및 분자량 범위 내에서 상이하고 뚜렷히 다른 위치에서의 단백질 농도를 강조 표시한다. MSC는 pH 7.0에 가깝고, 60,000 분자량 보다 크거나 동일한 것에서 상기 단백질 농도를 갖는다. 반면, AdSMC는 pH 4.0에 가깝고 분자량 60,000 미만에서 상기 단백질 농도를 갖는다. 또한, AdSMC는 pH 7.0에서의 겔의 우측 바깥 단부를 따라 있는 얼룩에 의해 나타난 바와 같이, MSC보다 pI 7 초과를 갖는 것으로 나타난 단백질을 더 많이 갖는다. 방광 평활근 세포는 대조군으로서 분석하였다. 박스는 모든 샘플 중에서 유사성의 영역을 나타낸다. AdSMC 단백질 프로파일이 MSC에 대해 관찰되는 패턴과는 뚜렷이 구별되며 방광-유래 SMC에 대한 프로파일과 가장 유사하다는 것이 명백하다 (하단 좌측 패널). 대동맥 평활근 세포도 추가의 평활근 세포 대조군으로서 분석하였다 (하단 우측 패널). 대동맥 평활근 세포와 방광 평활근 세포의 단백질체 시그너처는 거의 동일하다. 종합해 보면, AdSMC, 방광 및 대동맥 평활근 세포에 대한 프로파일 (이들 프로파일은 MSC의 프로파일과는 뚜렷이 상이함) 간에 유사성이 높다는 것은, MSC가 아니라, SMC가 지방 조직으로부터 단리되었다는 결론을 뒷받침한다. 모든 겔은 SPRYO 루비 염료로 염색하여 단백질 패턴을 가시화하였다.

[0927] **Ad-SMC의 성장 동력학은 MSC와는 현격하게 상이하다.** Ad-SMC의 증식 가능성은, 40 계대까지 성공적으로 확장되는 MSC와는 현저하게 상이하다 (문헌 [Bruder et al., J Cell Biochem., 64:278-294 (1997)]). 도 99에서 나타난 바와 같이, Ad-SMC는 배양시 제4일 내지 제5일 후에 증식 능력이 현격히 쇠퇴됨을 나타낸다. 본 발명자는 또한 Ad-SMC가 MSC와는 다르게 접촉 의존성 증식 억제를 나타낸다는 것을 밝혀냈다. 이러한 발견은 Ad-SMC가 자기 재생 능력이 없으며, 따라서 정의상 줄기 세포 또는 전구 세포가 아니라는 것을 입증한다. MSC는 증식의 접촉 억제를 나타내지 않으며, 형질전환 세포 배양에서 부위(foci) 형성과 유사하게, 이들은 서로의 위에 적층될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이는 이전의 발견과 일치한다 (Zhou et al. 2006 상동).

[0928] **Ad-SMC 및 MSC는 U46619로의 처리에 대해 뚜렷하게 반대로 반응한다.** 평활근 세포 관련 발달 경로의 활성화와 연관된 신호전달 캐스케이드를 표적화하는 소분자의 효과를 평가하기 위한 본 발명자의 노력의 일환으로, 본 발명자는 트롬복산 A2 모방체인 U46619에 집중하였으며, 이의 효과는 세포내 $Ca^{2+}$ 수준의 증가, 및 RhoA, CaM 및 MLC 키나제 신호전달 캐스케이드의 활성화의 증가를 포함한다. 이전에 보고된 바와 같이 (문헌 [Kim et al. 2009, Stem Cells. 27(1):191 -199]), 본 발명자는 MSC에서 U46619 (1μM)로의 처리가 핵심 평활근 세포 마커인 마이오카딘(myocardin) 및 SMMHC의 상향조절을 유도하는 것을 확인하였다. 그러나, Ad-SMC는 도 100에서 나타난 바와 같이 상기 동일 처리에 대해 마이오카딘 및 SMMHC 발현의 분명한 하향조절로 반응하였다. 이러한 결과는 Ad-SMC 및 MSC 간의 기능적 양분에 대한 명백한 증거를 제공한다.

[0929] **기능적 마커의 발현.** 도 101은 중배엽성 분화 마커의 RT-PCR 분석의 결과를 제공한다. 레인 목차: 1: MSC 대조군; 2:MSC 실험군; 3: AdSMC 대조군; 4: AdMSC 실험군; 5: 말초 혈액 대조군; 6: 말초 혈액 실험군; 및 7: H2O. 지방 세포 분화를 겪는 MSC 및 AdSMC에서의 중배엽성 분화 마커의 발현. AdSMC는 표준 조건하에서 성장 동안 MSC에 비해 오스테포틴의 현저히 높은 발현을 나타낸다 (n=1). Oct4B, Oct4A의 스플라이스-변이체, 다분화성에 대해 확립된 마커의 발현 (문헌 [Kotoula et al., 2008, Stem Cells. 26(1): 290-1])은 MSC에 비해 지방-유래 세포에서 현저하게 상향조절된다. MSC와 지방-유래 세포 둘다는 Oct4A의 발현을 나타내지 않았다.

[0930] 도 102는 MSC/AdSMC에서의 Oct4A/Oct4B 발현의 RT-PCR 분석 결과를 나타낸다. 레인 목차: 1: 방광 SMC; 2: HFF-1 (인간 섬유모세포); 3: MSC; 4: AdSMC; 5: 말초 혈액; 6: H2O. 매우 가깝게 관련되는 전사성 이소형 Oct4A 및 Oct4B의 발현은 MSC, AdSMC, 섬유모세포 및 SMC 라인에서 평가되었다. 평가한 모든 세포주는 Oct4B를 발현하였지만 (n=1), 다분화능 마커 Oct4A (Gong et al. 2009 상동)의 발현은 어떤 세포주에서도 관찰되지 않았다.

[0931] **논의.** 이번 보고서에서, 본 발명자는 지방-유래 세포 집단의 마커 발현을 평가하였다. 지방 조직은 내피세포, 혈관주위세포, 평활근 세포, 지방세포 및 MSC 를 포함하는 세포 종류의 이종 믹스를 나타낸다 (문헌 [Lin et al., Stem Cells Dev 2008;17:1053-1063]). 전혀 다른 조건에 대한 세포 조성물을 확립하는데 대한 어떤 체계적인 접근법도 없었기 때문에, 상이한 조건하에서 단리되고 상이한 밀도 및 배지 배합물에서 확장된 지방질의 기질 혈관 분획으로부터의 부착 세포는 종종 MSC로서 함께 분류되었다 (문헌 [Rebelatto et al., 2008 상동; Liu et al. 2007 상동; Jack et al. Biomaterials 2009;30:3259-3270]). 유사하게, 골수의 단핵 분획으로부터의 부착 세포는 전형적으로 MSC로 집합적으로 불린다. 그러나, 이들이 생체내에서 독특한 세포 종류를 나타내는지의 여부를 결정해야 하는 것이 남아있지만, 다수의 실험실은 전혀 다르지만 서로 중복되는 표현형 및 기능

적 특성을 갖는 줄기 세포 또는 전구 세포 집단 유래의 뚜렷한 골수를 단리해야 한다는 것을 주장한다 (문헌 [Ulloa-Montoya et al., J Biosci Bioeng 2005;100:12-27; Ratajczak et al. Folia Histochem et Cyto 2004;42:139-146; Lodie et al. Tissue Eng 2002;8:739-751]). 마찬가지로, 수많은 연구는 지방질 및 골수 유래 MSC 간의 기능적 및 표현형 유사성의 정도와 관련되는 결론이 충돌하는 것으로 보고되어 있다 (문헌 [Roche et al. Proteomics 2009;9:223-232; Noel et al. Exp Cell Res 2008;314:1575-1584]). MSC로서의 임의의 비-골수 유래 기질 세포 집단의 확인은 생체내 이소성 소골 형성 분석의 적용을 통해 의문이 제기되고 있으며, 이는 오로지 골수 유래 기질 세포만이 MSC로서 레이블될 수 있다는 것을 의미한다 (문헌 [Kalz et al. Stem Cells 2008; 26:2419-24]). 이러한 데이터에도 불구하고, 지방-유래 MSC 및 골수 유래 MSC는, 정량적인 PCR-기반 계통 분석에 의해 평가되는 바와 같이, 서로 중복되지만 독특한 분화 가능성을 공유하는 것으로 간행 문헌의 평가로부터 합리적으로 결론낼 수 있다 (문헌 [Roche et al. 2009 상동; Noel et al. 2008 상동; Rebelatto et al. 2008 상동; Liu et al. 2007 상동]).

[0932] 본 발명자는 TaqMan Q-RTPCR를 이용하여 초기의 부착 지방 기질 혈관 분획-유래 세포의 분석을 개시하였다. 도 91 및 92에서 나타낸 바와 같이, 본 발명자는 SMαA, SM22, SMMHC, 칼포닌 및 마이오카딘의 발현에 의해 나타나는 바와 같이 평활근 세포 표현형을 일관되게 나타내는 세포 집단을 단리할 수 있다. 내피 및 지방세포 마커는 또한 평판배양 후 초기 24 내지 28시간의 기회 내에 검출가능하지만, 상기 집단은 다른 세포 특징의 발생 정도가 계대될수록 감소하기 때문에 평활근 특징을 보유하고 있다 (도 91, 92, 표 7). 지방세포형성 마커의 발현은 급격하게 쇠퇴하는 것으로 관찰되었다 (표 7). 지방질로부터의 MSC의 단리에 대해 기재하고 있는 다른 보고 및 이들의 조직 공학으로의 후속 적용과는 다르게, 유도성 사이토킨 또는 추가의 외인성 성장 인자는 평활근 관련 유전자 발현 시그너처의 직접적인 분화를 요구하지 않는다 (Jack et al. 2009 상동).

[0933] Ad-SMC는 평활근 세포 관련 마커의 유전자 및 단백질 발현, 및 $Ca^{2+}$ 의존성 수축성에 의해 정의되는 바와 같이 방광-유래 평활근 세포와 직접적으로 비교할 수 있다 (문헌 [Basu et al., 2009 in preparation; Basu et al. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting , July 8-11, 2009]). Ad-SMC의 단리는 특정 배지 배합물 중에서의 단리에 직접적으로 의존하고 - 도 91b에 나타낸 바와 같이, 평활근 세포 마커의 발현은 DMEM-HG 배지 중에서의 확장 여부에 따라 달라진다. 다른 배지 종류에서의 성장은 평활근 세포 관련 특징의 손실을 야기하고, 가능하면 보다 많은 중간엽 전구세포 집단에 대해 풍부해지는 것을 초래한다 (Gong et al. 2009 상동). 상기 목적을 위해, 고밀도에서의 배지 또는 확장 중의 고글루코스 수준의 존재는 왕성한 MSC 분화 가능성의 표명에 해롭다는 것을 나타내고 있다 (Lund et al. 2009 상동). 추가의 연구는 고글루코스 배지에 비해 저글루코스 배지 중에서 MSC의 골형성 분화 가능성이 증가한다는 것을 나타내고 있다 (문헌 [Jager et al. Biomed Tech (Berl) 2003;48:241-244]). 글루코스 및 다른 당과 관련되는 최종 당화 산물의 존재는 MSC의 분화 가능성의 손실을 야기시키는 것으로 제안되어 있다 (문헌 [Kume et al. J Bone Miner Res 2005;20:1647-1658]). 종합해 보면, 이러한 발견은 고밀도 및 고글루코스의 조건하에 지방질-SVF 유래 세포의 확장이 평활근 세포 표현형에 대한 선별, 및 MSC 특성의 획득에 대한 선별하게한다는 것을 입증한다.

[0934] 유전자 발현 접근법에 계속해서, 본 발명자는 표 18.1 및 18.2의 어레이 PCR 데이터 패널을 이용하여 Ad-SMC와 MSC를 일관되고 분명하게 구별하는 마커의 코어 기를 확인하였다. BMP6, CD44 및 IL-1β는 MSC에 비해 Ad-SMC에서 적어도 30배 초과의 발현을 나타내는 한편, GDF5, HGF, LIF, MCAM, RUNX2 및 VCAM1는 Ad-SMC에 비해 MSC에서 적어도 30배 초과의 발현을 입증한다. 이러한 결과는 다수의 공여자 샘플에 대해 일치하며 (n=3), 본 발명자의 발견이 유전자 발현 수준에서의 공여자 가변성 또는 무작위적 변동의 결과가 아니라는 것을 제시한다. BMP6은 MSC 분화 중에 연골형성 및 골형성의 조절과 관련되는 TGF-β 슈퍼패밀리의 일원이다 (문헌 [Henning et al. J Cell Physiol 2007;211:682-291; Friedman et al. J Cell Biochem 2006;98:538-554]). BMP6 발현의 상향조절을 나타내는 본 발명자의 데이터는 Ad-SMC가 지방-유래 MSC와 명백하게 구별되는 한편, BMP6 발현의 하향조절은 골수 유래 MSC에 대해 관찰된다 (Henning et al. 2007 상동). 놀랍게도, 외인성 BMP6을 이용한 지방질-유래 MSC의 유도는 TGF-β1 수용체의 발현에서 상향조절을 유도한다 (Henning et al. 2007 상동). TGF-β 신호전달 경로는 평활근 세포 특정 발달 경로의 활성화에서 중요한 역할을 하는 것으로 익히 확립되어 있다 (문헌 [Owens et al. Acta Physiol Scand 1998;164:623-635]). CD44는 MSC-유사 세포의 익히 공지된 마커이며, 세포 성장, 이동 및 귀소와 광범위하게 관련된다 (문헌 [Khaldoyanidi S. Cell Stem Cell 2008;2:198-200]). 지방질 및 골수 유래 MSC 간의 CD44의 발현은 전체 발현, 전사성 스플라이스 변이체의 조절, 및 유전자 발현의 전체 안정성의 면에서 유사하다는 것을 나타내고 있다 (문헌 [Peroni et al. Exp Cell Res 2008;314:603-615]).

[0935] Ad-SMC보다 MSC에서 상향 조절되는 것으로 밝혀진 유전자는 MSC에서의 연골형성 및 골형성 분화의 조절에 중요한 것으로 나타난 GDF5, 및 HGF를 포함한다. HGF 및 그의 동족 수용체 c-met는 골수 유래 MSC에서의 운동성 및 증식의 조절로 확인되었다 (문헌 [Neuss et al. Stem Cells 2004;22:405-414]). 이전의 보고서와 일치하게도, 본 출원인은 MSC와 Ad-SMC를 분리하는 중대한 구별 특징이 되는 전-염증성 사이토킨 LIF의 발현을 관찰하였다 (문헌 [Majumdar et al. J Hematother Stem Cell Res 2000;9:841-8]). 중요하게는, LIF는 MSC에서 전구세포 상태의 중대한 마커로서 작용하여, 최대 분화 잠재력의 대리 역할을 한다 (문헌 [Whitney et al. Tissue Eng Part A 2009;15:1]). 이러한 관찰은 Ad-SMC가 평활근 세포 집단을 나타낸다는 본 출원인의 해석과 일치하는 것이다. MCAM (CD146)은 지방 (문헌 [Zannettino et al. J Cell Physiol 2008;214:413-421]) 및 골수 (문헌 [Baksh et al. Stem Cells 2007;25:1384-92])의 혈관주위 니치로부터 유래한 MSC와 밀접하게 연관된 세포 표면 마커이다. CD146의 발현은 지방 또는 골수로부터의 MSC-유사 세포 집단의 줄기 세포 잠재력과 밀접하게 상호관련되는 것으로 여겨진다 (상기 문헌 [Zannettino et al. 2008]; 상기 문헌 [Baksh et al. 2007]; [Gronthos et al. J Cell Physiol 2001;189:54-63]). RUNX2는 MSC의 분화 동안 골형성의 조절에 관여하는 전사 인자이다 (문헌 [Isenmann et al., Stem Cells 2009]). 세포-부착 마커 VCAM1 (CD106)의 발현 또한 지방 (상기 문헌 [Zannettino et al. 2008]) 또는 골수 (문헌 [Brooke et al. Stem Cells Dev 2008;17:929-40])로부터 단리된 MSC의 특징이다. 끝으로, Ad-SMC는 지방 또는 골수로부터 단리된 MSC와 달리, MHC 클래스 II의 강력한 발현을 나타낸다 (문헌 [Niemeyer et al. Tissue Eng 2007;13:111-121]).

[0936] 종합하면, 유전자 발현 데이터는 Ad-SMC가 MSC-유사 세포 집단이 아니라 보다 완전하게 분화된 SMC 집단을 나타냄을 시사한다. 이러한 해석은 Ad-SMC 및 MSC가 별개의 독특한 단백질체 특징을 가짐을 증명하는 도 39에 나타낸 Ad-SMC와 MSC의 2D 전체 단백질체 비교에 의해 입증된다. Ad-MSC 단백질체 프로파일과 지방-유래 MSC 및 다른 클래스의 줄기 세포 또는 전구 세포에 대해 보고된 것과의 추가 비교는, 존재한다면, 거의 유의하지 않은 중복을 나타낸다 (상기 문헌 [Noel et al. 2008]; 상기 문헌 [Rebelatto et al. 2008]). 방광-유래 평활근 세포와 비교가능한 기능적 수축성뿐만 아니라 내피 마커의 상실 및 다발성 성숙 평활근 세포 마커의 연관된 발현을 고려하면 (문헌 [Basu et al., 2009 in preparation]; [Basu et al. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009]), 이들 데이터는 Ad-SMC가 MSC가 아니라 사실상 평활근 세포임을 강력하게 시사한다.

[0937] 앞서 논의된 유전자 발현 연구와 병행하여, 본 출원인은 골수 유래 MSC 및 Ad-SMC 둘 다에 대한 중대한 MSC-연관 세포 표면 마커의 발현을 FACS에 의해 조사하였다. 둘 다의 세포 유형은 CD90+ 및 CD105+에 대하여 일관적으로 양성이었지만, MSC에 대해 잘 확립된 마커인 CD73에 대해서는 음성이었고, 이는 표준 MSC 마커 발현에서의 상당한 이질성에 대한 잠재력을 시사한다 (문헌 [Chamberlain et al. Stem Cells 2007;25:2739-49]). 게다가, Ad-SMC는 지방 또는 골수 공급원으로부터 유래한 MSC로부터 그들을 명확하게 구별하는 CD45+ CD117+ (도 96)인 것으로 관찰되었다 (문헌 [Lee et al. Cell Physiol Biochem 2004;14:311-324]). CD45+ 구획의 확인은 MSC와 달리, 조혈 기원의 하위 집단의 존재를 시사한다. 이러한 관찰에도 불구하고, 본 출원인은 MSC로 CD73, CD90 및 CD105와 같은 세포 표면 마커를 확인하는 것이 본질적인 생물학적 유의성을 갖지 않으며, 해당 분야의 역사적인 진전 동안 창조된 작위적 결과로 간주될 수도 있다고 생각한다 (상기 문헌 [Dominici et al. 2006]). AD-SMC는 MSC와 상기 전형적인 세포 표면 마커 중 일부 (예를 들면, CD90 및 CD105)를 공유할 수도 있지만, 그들은 다른 확립된 마커 (예컨대 CD34, CD45 및 CD117)의 발현에서는 MSC와 분명하게 별개이다. 그러므로, 본 출원인 및 다른 이들이 MSC와 일반적으로 연관된 다수의 동일한 마커를 확고하게 발현하는 다중의 완전하게 분화된 세포 유형을 관찰하였을 때, 이들 마커가 차별적인 가치를 갖는다고 생각하는 것은 곤란하다 (문헌 [Jones et al. Rheumatology 2008;47:126-131]). 현재의 보고서에 나타낸 MSC 및 Ad-SMC의 조합된 전사체, 단백질체 및 기능적 분석은 MSC 및 Ad-SMC가 생물학적으로 별개인 세포 집단을 나타내는지 아닌지를 평가하는 데 보다 유용할 것이다 (상기 문헌 [Lodie et al. 2002]; 상기 문헌 [Gong et al. 2009]).

[0938] 본 출원인의 Ad-SMC 및 MSC에 대한 기능적 비교는 성장 동역학, 평활근 표현형 및 평활근 세포 특이적 신호전달 경로를 표적으로 하는 소형 분자 약물에 대한 반응의 분석에 초점을 맞추었다. 줄기 세포의 중대한 특징은 자기-재생에 대한 수용력이다. MSC는 다-계통 분화에 대한 잠재력을 유지하면서 적어도 25-40 계대로 확장하는 능력에 의해 증명되는 바와 같은 자기-재생 수용력을 가진다 (문헌 [Tintut et al. Circulation 2003;108:2505-2510]; [Reyes et al. Blood 2001;98:2615-2625]; [Bruder et al. J Cell Biochem 1997;64:278-294]). 반면에, 도 99에 나타낸 바와 같이, Ad-SMC는 4-5일의 초기 플레이팅 내에 성장 잠재력에서의 급격한 저하를 나타내며, 이는 그들의 종결적으로 분화된 평활근 세포 유형으로서의 확인과 일치한다. 임의의 자기-재생 수용력에 대한 징후는 존재하지 않았다.

[0939] 줄기 세포 및 전구 세포 집단의 또다른 특징은 외인성 성장 인자, ECM 및 세포외 환경의 다른 제어가능한 성분의 조합을 사용하여 한정된 발생 계통을 따라 유도되는 분화에 대한 요건이다. 수많은 보고서들이 조직 공학 및 재생 의약에의 적용을 위한 지방 또는 골수로부터의 MSC의 조절된 분화에 초점을 맞추어 왔다. 예를 들면, 지방-유래 MSC는 래트 방광절제술 모델에서 기능성의 증거가 증명된 중합체 방광 천장 유사 지지체 구조를 시딩하기 전 6주까지 100 U/ml 헤파린을 함유한 유도 매질을 사용하여 평활근 유사 세포로 분화되었다 (상기 문헌 [Jack et al. 2009]). 또한, 스핑고실포스포릴콜린, 브라디키닌 및 안지오텐신 II를 비롯한 TGF-β 신호전달 경로를 표적으로 하는 소형 분자 효능제 또는 TGF-β 또한 지방 또는 골수 유래 MSC로부터 평활근 유사 표현형을 유도하는 데 사용되었다 (상기 문헌 [Gong et al. 2009]; [Kim et al. Cell Signal 2008;20:1882-1889]; 상기 문헌 [Jeon et al. 2006]; [Kim et al. Int J Biochem Cell Biol 40;2482-2491]). 덜 표적화된 접근법인 DNA 탈메틸화제 5-azaC에 의한 후성유전체 재프로그래밍은 골수-유래 MSC를 심근세포 유사 표현형으로 유도하는 데 사용되었다 (문헌 [Xu et al. Exp Biol Med 2004;229:623-631]). 역분화된 지방세포도 또한 TGF-β를 사용하여 평활근 계통을 따라 유도될 수 있으며, 마우스 방광 손상 모델에서 방광 조직 재생에 기여하는 것으로 보고된 바 있다 (문헌 [Sakuma et al. J Urol 2009 Jul;182(1):355-65. Epub 2009 May 20]). 끝으로, 골수 유래 세포로부터 평활근 세포를 TGF-β 유도 분화하는 방법이 기재된 바 있다 (문헌 [Kanematsu et al. Am J Pathol 2005;166:565-573]; [Becker et al. Int J Artif Organs 2008;31:951-9]). 종합하면, 이들 보고서는 전형적으로 유도 사이토킨 또는 소형 분자 효능제로의 처리 전에 임의의 평활근 세포 연관 마커를 거의 또는 전혀 발현하지 않는 MSC-유사 집단을 제시한다.

[0940] 이와는 현저하게 달리, 본 출원인은 임의의 외인성 작용제에 의한 유도된 분화에 대한 요건 없이, 성숙 평활근 세포와 전형적으로 연관된 것들 (SmαA, SM22, SMMHC, 칼포닌 및 마이오카딘)을 비롯한 모든 중대한 평활근 연관 마커를 발현하는 지방으로부터 평활근 세포 집단을 직접적으로 단리하고 확장할 수 있었다 (문헌 [Owens et al. Physiol Rev 2004;84:767-801]). 이러한 관찰은 Ad-SMC가 초기 단리로부터 이미 보다 완전하게 분화되고 MSC와 근본적으로 별개인 세포 집단을 나타냄을 강력하게 시사한다. 외인성 성장 인자의 첨가 없이 고 밀도로 다중 계대접종한 후 돼지 골수 유래 MSC에 의해 평활근 유사 특징을 획득하는 것이 최근에 제시된 바 있다 (문헌 [Shukla et al. World J Urol 2008;26:341-349]). 그러나, 상기 보고서와 달리, 본 출원인은 다중의 독립적인 표본 (도 94에 나타낸 바와 같이 n=174)을 가로질러 최초의 계대로부터 분명한 평활근 세포 표현형을 갖는 Ad-SMC를 단리할 수 있었다. 콘플루언스 상태에서의 연장된 성장 동안 "분화"에 대한 요건은 존재하지 않았다.

[0941] 이질적인 독립적 키나제를 통해 수축성을 조절하는 신호전달 캐스케이드를 갖는 다발성 평활근 세포 특이적 유전자 발현 경로의 동등 조절, 소위 "흥분-전사" 커플링 (문헌 [Wamhoff et al. Circ Res 2006;98:868-878])은 트롬복산 A2 (TxA2)의 안정적인 유사체인 U46619에 의해 조정된다. U46619로의 처리는 지방-유래 MSC에서의 SRF 및 마이오카딘 발현 증가 및 평활근 세포 특이적 마커 SMαA, 칼포닌, 스무델린 및 SMMHC의 연관된 상향 조절을 유발하는 것으로 나타났다 (상기 문헌 [Kim et al. 2009]). 흥분-전사 커플링에 대한 TxA2의 효과는 기원의 조직과 관계없이, MSC에 대한 기능적 핑거프린트로서 작용하는 것으로 여겨진다. 본 출원인은 지방-유래 MSC에 대해서 관찰된 바와 같이, 골수 유래 MSC가 U46619로의 처리 시 평활근 마커의 상향 조절을 재현하는 것을 관찰하였다 (상기 문헌 [Kim et al. 2009]). 그러나, 도 100에 나타낸 바와 같이, 중대한 기능적 평활근 마커인 마이오카딘 및 SMMHC의 명확한 하향 조절을 나타냄으로써, Ad-SMC는 U46619에 대해 완전히 반대되는 방식으로 반응한다. 분명하게, MSC에서 관찰된 바와 같은 흥분-전사 커플링에 관여하는 신호전달 캐스케이드의 구성 및 조절은 Ad-SMC에서는 근본적으로 상이하다. 이러한 관찰은 Ad-SMC가 지방 또는 골수 유래 MSC와 기능적으로 별개이며, 사실상 생물학적으로 독특한 세포 집단을 나타낸다는 결정적인 증거를 제공한다.

[0942] Ad-SMC는 어느 곳으로부터 발원되며, 그들의 MSC에 대한 관계는 어떠한가? 지방은 대량의 혈관이 분포된 조직이며, 수많은 연구가 MSC뿐만 아니라 평활근 및 내피 세포에 대한 잠재적 공급원으로서 혈관주위 니치를 관련시켰다 (문헌 [Caplan J Pathol 2009;217:318-324]). MSC 분화 잠재력을 갖는 혈관주위세포는 혈관뿐만 아니라 신체 전반에 걸친 다수의 기관계로부터 직접적으로 단리되었다 (상기 문헌 [da Silva Meirelles et al. 2006]; [da Silva Meirelles et al. Tissue Eng Part A 2009Feb;15(2):221-9]; 상기 문헌 [Tintut et al. 2003]). 그러나, SMαA+ 세포는 지방-유래 혈관상의 모든 모세혈관, 소동맥 및 소정맥에 국지화되어 있지만, 중대한 MSC-특이적 마커인 STRO-1의 발현은 내피와 엄중하게 연관되어 있으며, 단지 한 서브세트의 혈관 내에서만 추가적으로 발견되었다 (문헌 [Lin et al. Stem Cells Dev 2008;17:1053-1063]). 게다가, 줄기 세포-특이적 마커 Oct4 및 텔로머라제의 발현은 단지 드물게만 관찰되어, 진정으로 다능한 전구세포는 지방 내에 흔하지 않음을 시사하였다 (상기 문헌 [Lin et al. 2008]). 상기 문헌 전반에서, 이러한 관찰은 MSC, 내피 및 평활근이 보다 광범위한 혈관주위 니치 내에서 별개의 공간을 차지함을 가리킨다. 그럼에도 불구하고, 발생 계통을 가로지르

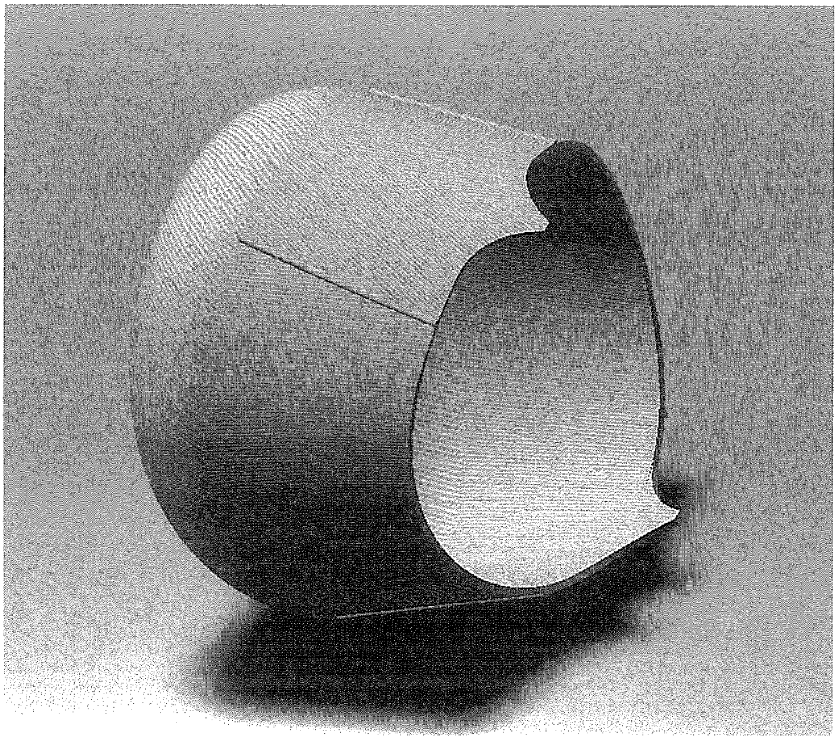
는 상당한 변동에 대한 가능성은 여전히 남아있다. 예를 들면, 내피 세포는 TGF-β에 대한 반응 또는 전-혈관신생 인자의 고갈 및 내피 세포-세포 접촉의 상실 시에 평활근 세포 유사 표현형으로 계통 전환될 수 있는 것으로 여겨진다 (문헌 [Krenning et al. Trends Cardiovasc Med 2008;18:312-323]; [Krenning et al. Biomaterials 2008;29:3703-3711]).

[0943] 끝으로, 내피 및 평활근 표현형뿐만 아니라 제한된 간엽 분화 잠재력을 갖는 부착 세포 유형이 성인 말초 혈액 내에서 순환하는 것이 확인되었다 (문헌 [He et al. Stem Cells 2007;25:69-77]). 본 출원인은 인간 성인 말초 혈액으로부터 직접적으로 그들을 유의미한 수로 정제할 수 없었지만 (본 출원인의 미공개 관찰결과), 상기 순환하는 평활근 세포는 지방-유래 평활근 세포의 집단에 기여할 수 있다. 장기간 배양에서의 MSC도 또한 평활근 세포 유사 분화 경로를 따른다는 것을 고려할 때 (문헌 [Dennis et al. Stem Cells 2002;20:205-214]), 본 출원인은 종합적으로, 공개된 데이터뿐만 아니라 본 출원인의 관찰결과가 다양한 정도의 증식성 및 분화 잠재력을 갖는 평활근, 내피 및 MSC 세포 유형의 광범위한 연속체에 대한 공급원으로서 혈관주위 니치와 일치하는 것으로 생각된다. MSC의 유도된 분화에 의해 생성되거나 지방으로부터 직접적으로 단리된 평활근 세포는 간엽 분화 형성력의 증거를 계속적으로 나타내지만 (상기 문헌 [Kim et al. 2009]; 본 출원인의 미공개 관찰결과), 그럼에도 불구하고, 본 출원인은 골수 또는 지방 SVF 기원의 MSC에 대해 명확한 기능적 및 표현형적 차이를 갖는 지방-유래 평활근 세포로, 스펙트럼의 마주보는 말단 사이에 분명한 구분을 지을 수 있을 것으로 생각된다.

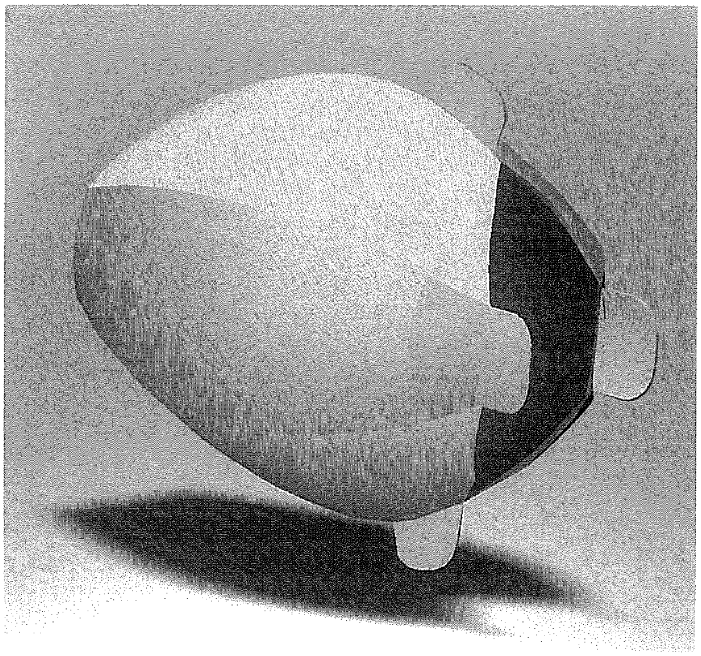
[0944] 끝맺음으로, 본 출원인은 지방의 PO 부착 기질 혈관 일부로부터 직접적으로 Ad-SMC를 단리하는 것은 매질 배합물에 크게 의존함을 증명하였다. 평활근 세포 마커의 발현은 확고하고, 일관적이며, 공여체 공급원에 독립적이고, 계대를 가로지른다. 본 출원인은 Ad-SMC가 유전자 발현, 단백질체 및 표면 마커 분석에 의해 증명된 바와 같이 MSC와 표현형적으로 별개이며, 평활근 세포 연관 신호전달 경로를 표적으로 하는 약제에 대한 그들의 반응에 의해 평가된 바와 같이 MSC와 기능적으로 별개임을 나타내었다. 다른 공개 보고서들과 달리, 이들 평활근 세포의 단리는 TGF-β 또는 관련 소형 분자에 의해 유도된 분화를 요구하지 않는다. Ad-SMC는 4-5 계대 내에 $10^7$개까지의 세포로 확장될 수 있고, 최대 범위의 평활근 세포 연관 마커를 발현하며, 시험관내 ($Ca^{2+}$-의존 수축성) 및 생체내 (돼지 방광절제술 모델에서의 네오-요로관 재생) 둘 다에서 방광-유래 SMC와 기능적으로 비교가능하다 (문헌 [Basu et al., 2009 in preparation]; [Basu et al. International Society for Stem Cell Research, 7th Annual Meeting, July 8-11, 2009]). 이들 데이터는 상기 집단이 보다 정확하게 지방-유래 평활근 세포 (Ad-SMC)로서 설명되며, 내피 세포 및 MSC를 비롯한 다른 클래스의 지방-유래 세포와 비교할 때 분리되고 별개인 집단을 나타낸다는 결론을 지지한다.

## 도면

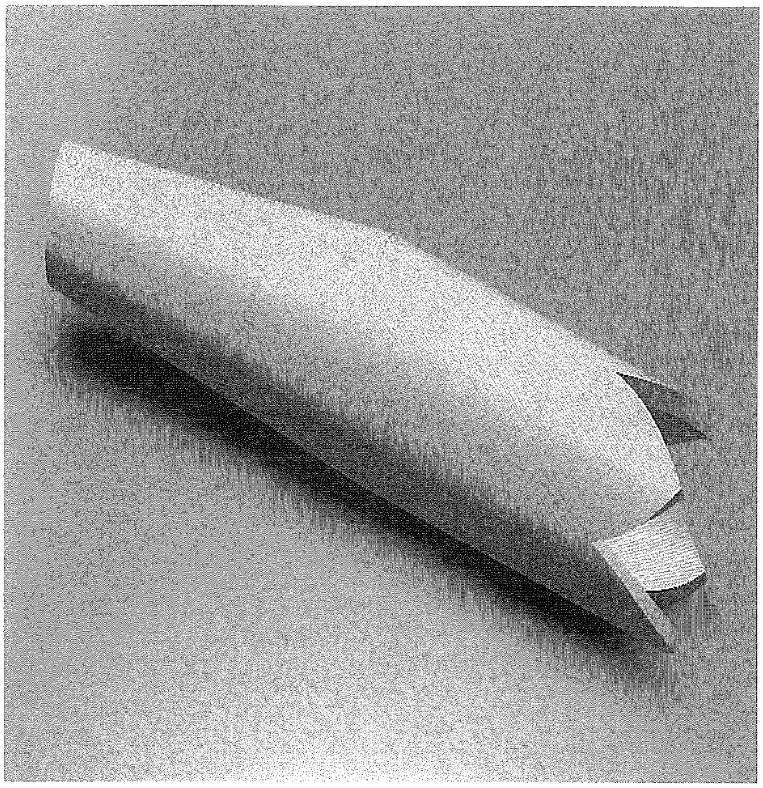
### 도면1



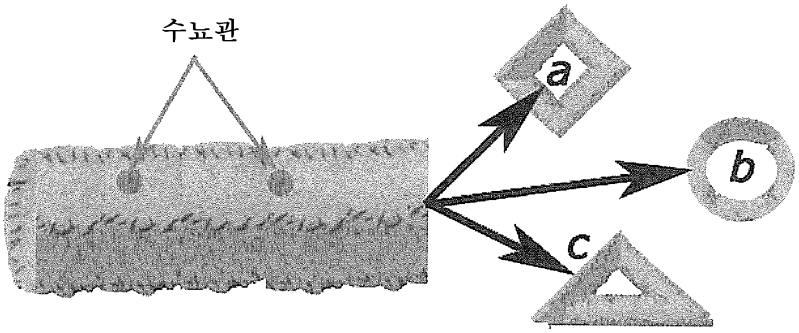
### 도면2



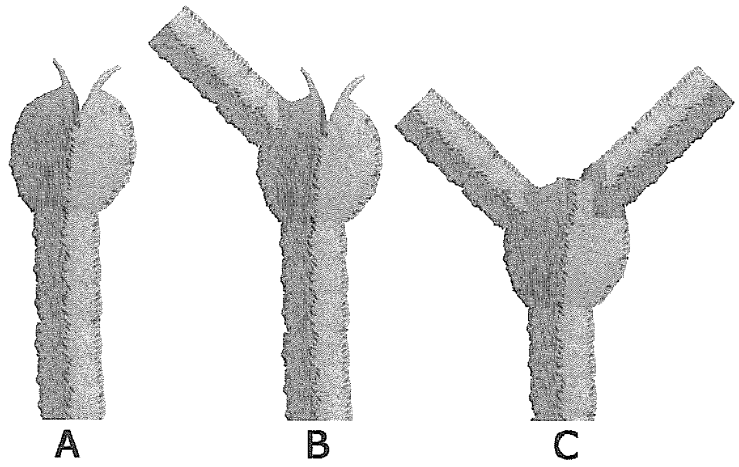
도면3



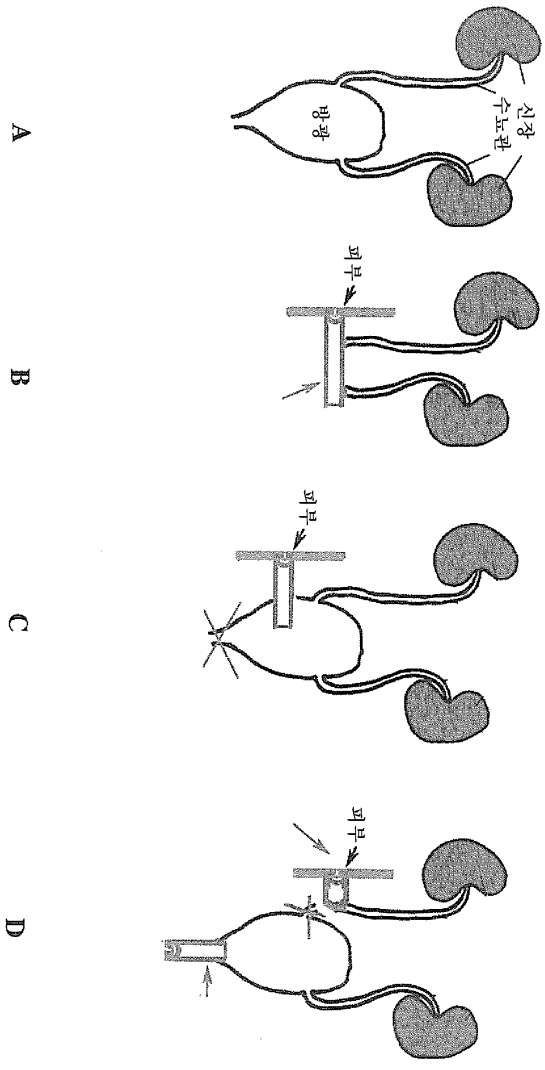
도면3a



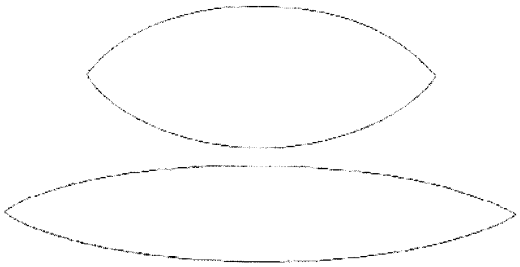
도면3b



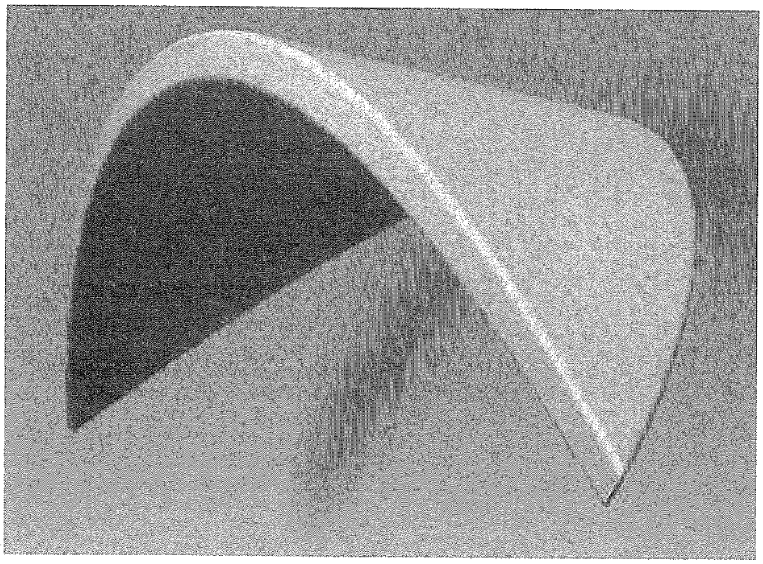

도면4



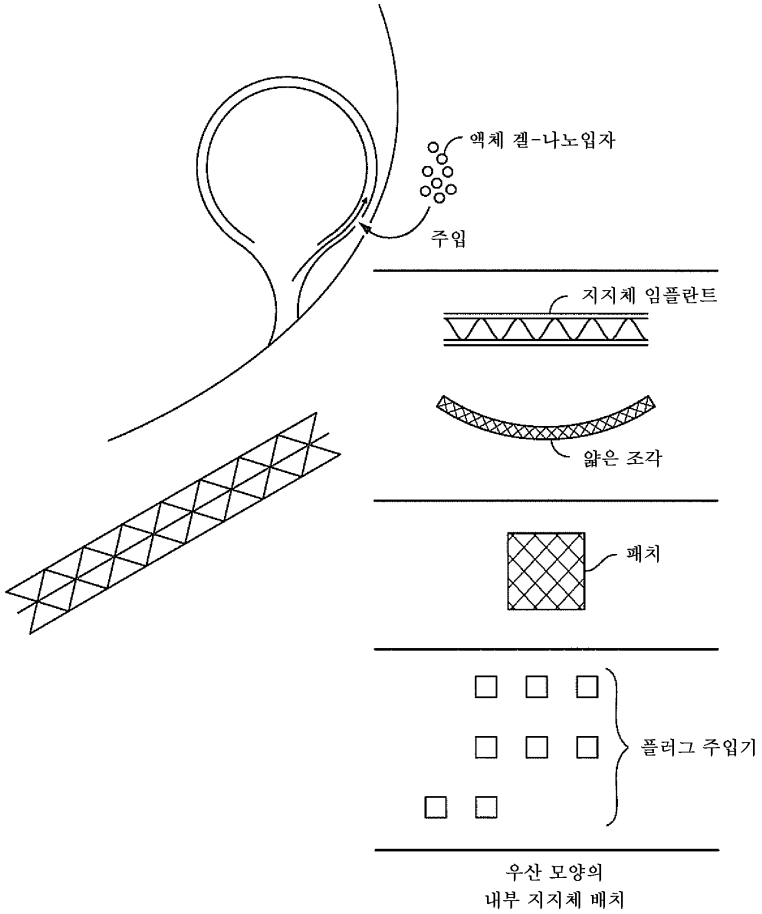
도면5a



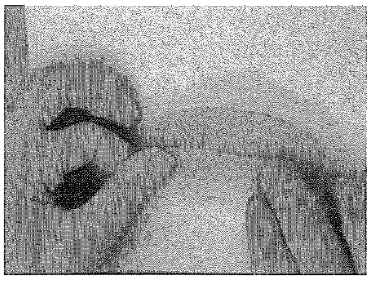
도면5b



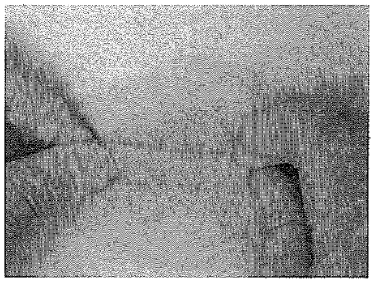
도면6



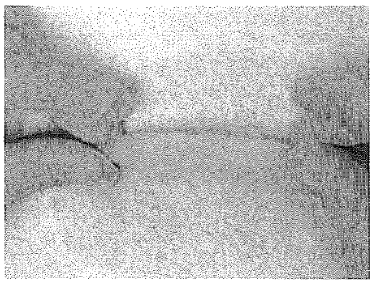

도면7a



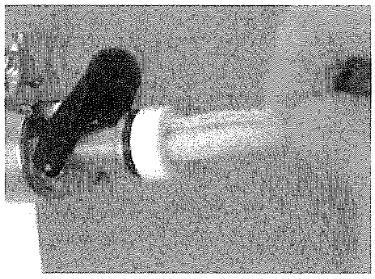
도면7b



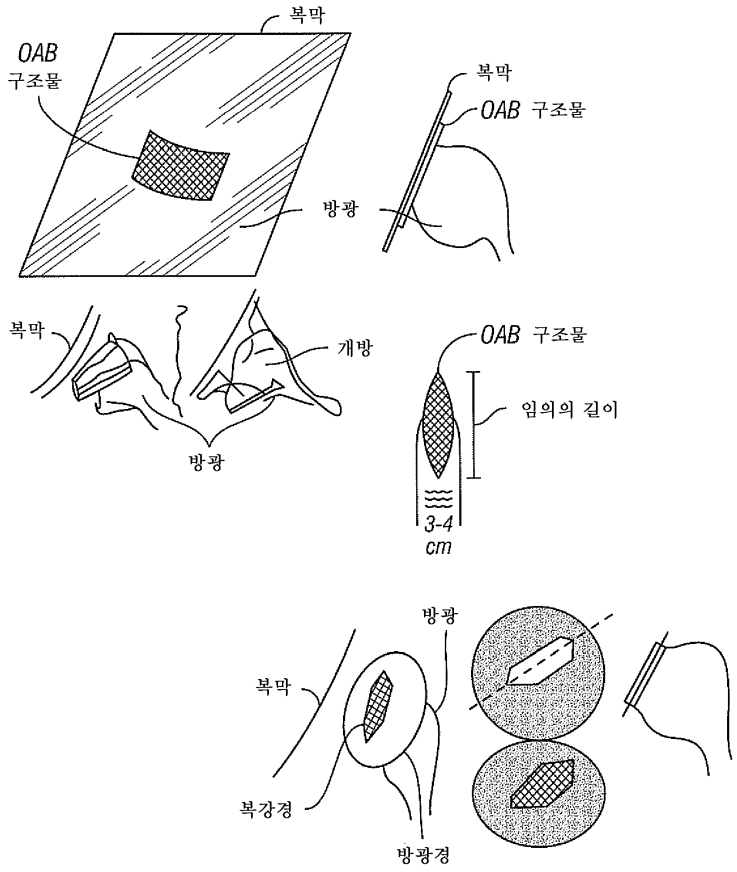
도면7c



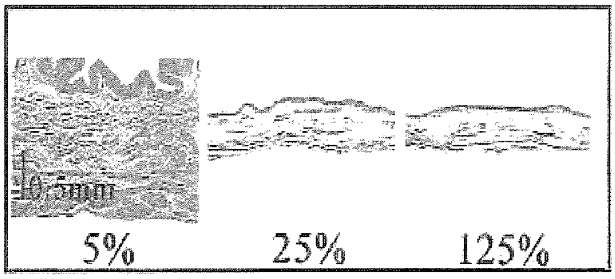
도면7d



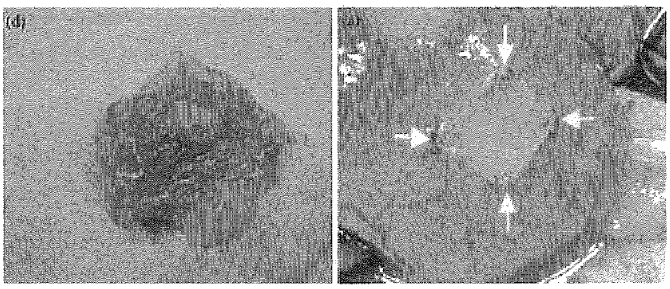
도면7e



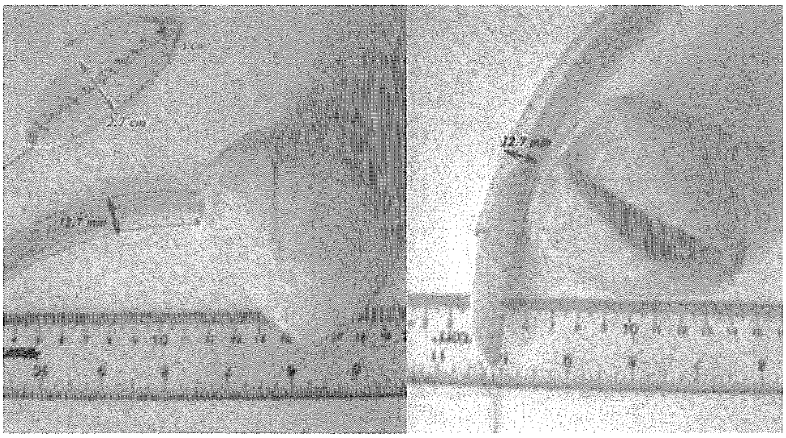
도면7f



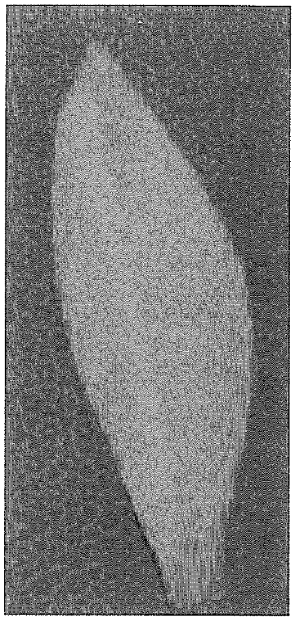

비어있는 상태의 임플란트 가득 찬 상태의 임플란트



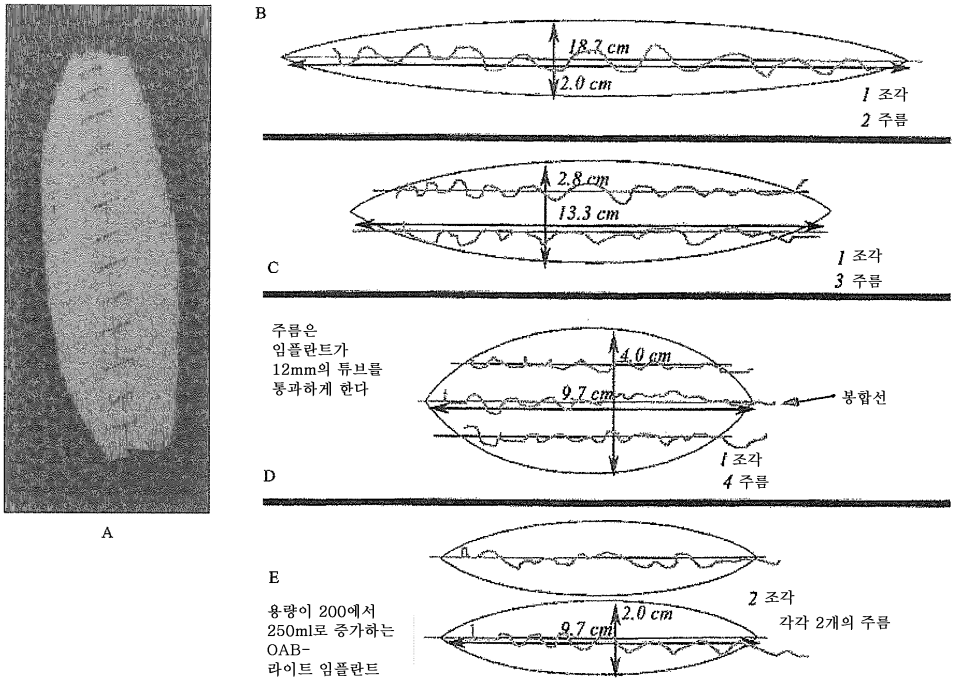
도면7g



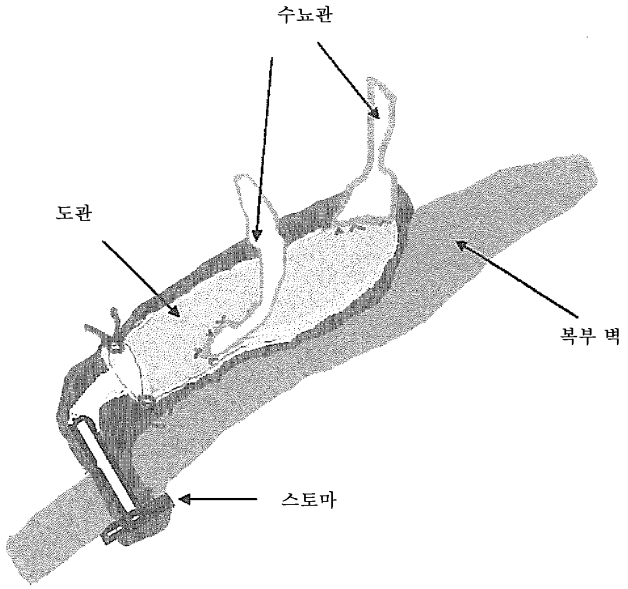
도면8



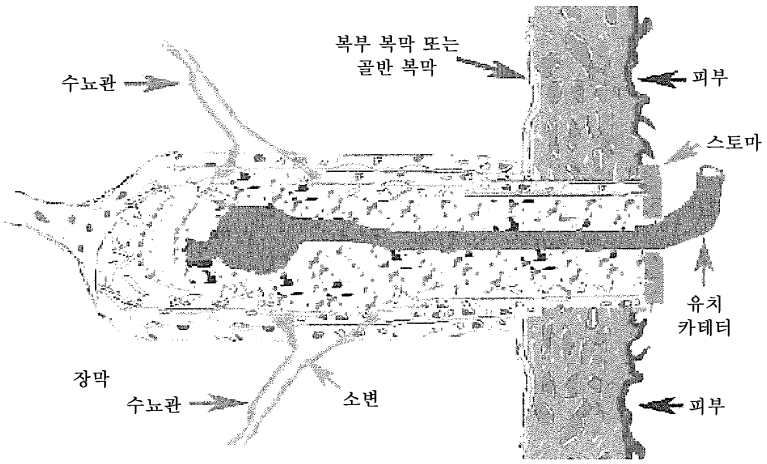
도면9


A
B
18.7 cm
2.0 cm
1 조각
2 주름
C
2.8 cm
13.3 cm
1 조각
3 주름
주름은
임플란트가
12mm의 튜브를
통과하게 한다
D
4.0 cm
9.7 cm
봉합선
1 조각
4 주름
E
용량이 200에서
250ml로 증가하는
OAB-
라이트 임플란트
2 조각
각각 2개의 주름
2.0 cm
9.7 cm

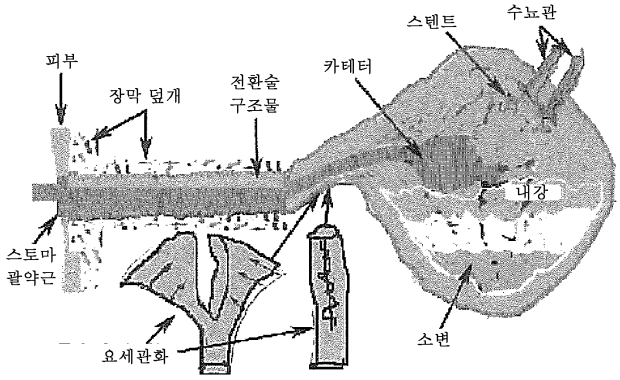
도면10



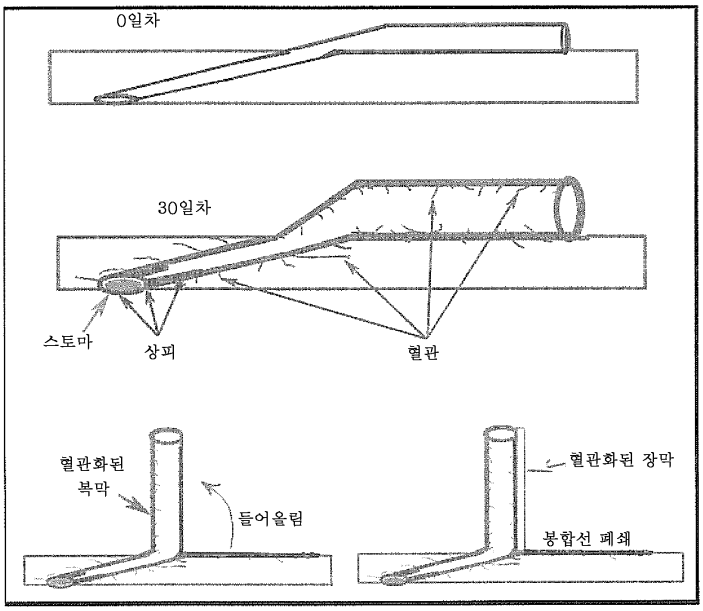

도면11



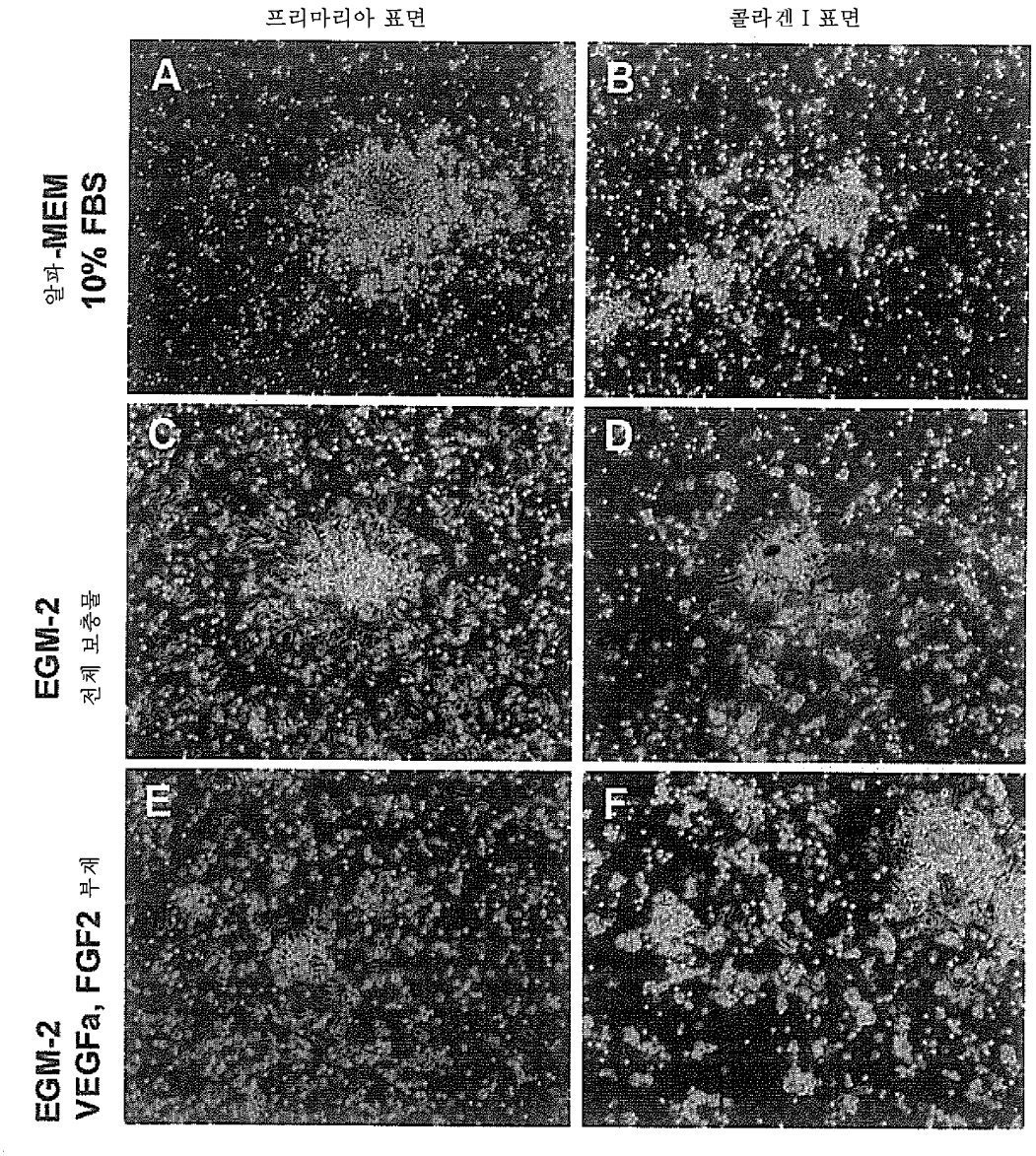

도면12



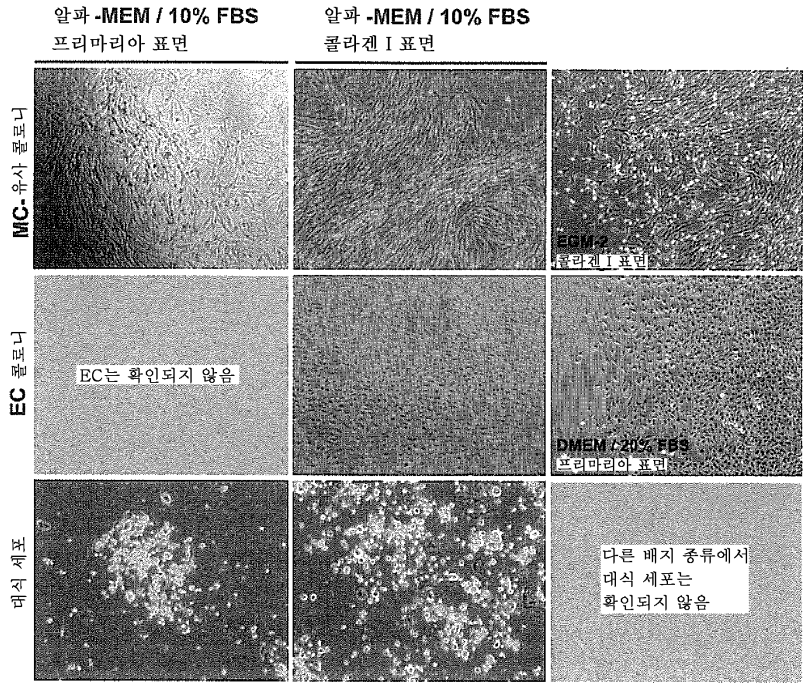
도면13



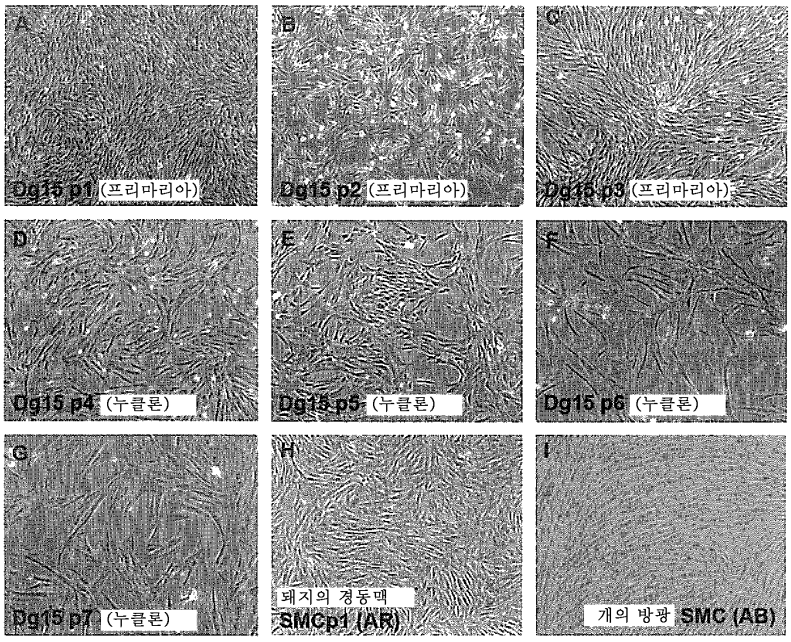
도면14


프리마리아 표면
콜라겐 I 표면
알파-MEM 10% FBS
EGM-2 전체 보충물
EGM-2 VEGFa, FGF2 부재
A
B
C
D
E
F

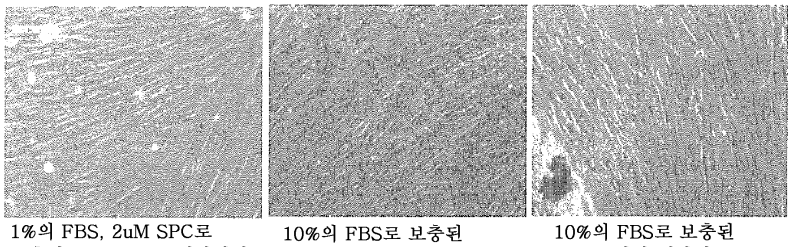
도면15


알파 -MEM / 10% FBS
프리마리아 표면
알파 -MEM / 10% FBS
콜라겐 I 표면
MC- 유사 콜로니
EC 콜로니
대식 세포
EC는 확인되지 않음
EGM-2
콜라겐 I 표면
DMEM / 20% FBS
프리마리아 표면
다른 배지 종류에서
대식 세포는
확인되지 않음

도면16


A
Dg15 p1 (프리마리아)
B
Dg15 p2 (프리마리아)
C
Dg15 p3 (프리마리아)
D
Dg15 p4 (누클론)
E
Dg15 p5 (누클론)
F
Dg15 p6 (누클론)
G
Dg15 p7 (누클론)
H
돼지의 경동맥
SMCp1 (AB)
I
개의 방광 SMC (AB)

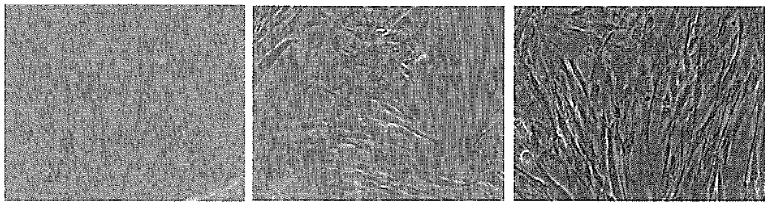
도면17



1%의 FBS, 2uM SPC로 보충된 MCDB 131 배지에서 배양된 돼지 지방

10%의 FBS로 보충된 DMEM에서 배양된 돼지 지방

10%의 FBS로 보충된 DMEM에서 배양된 돼지 방광

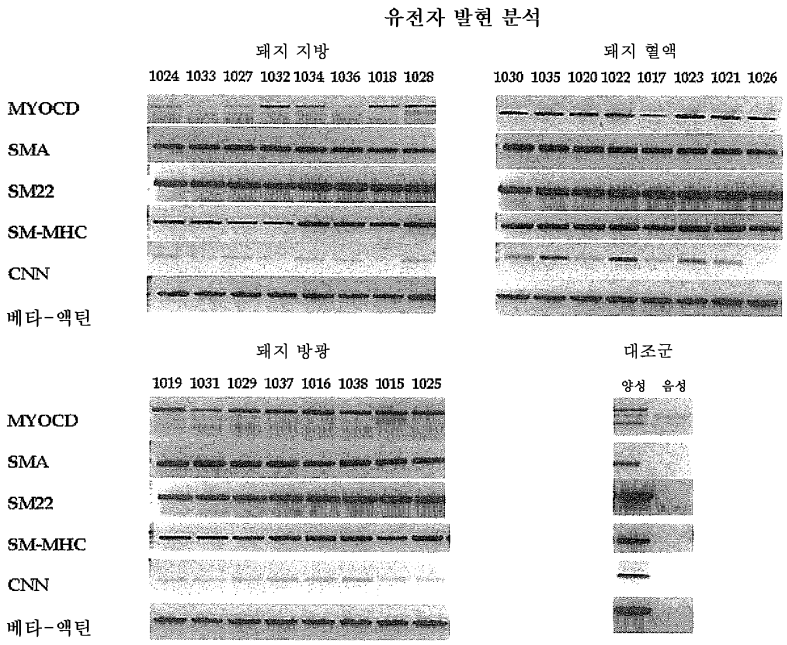


알파-MEM+ 10% FBS에서 배양된 인간의 지방 세포

DMEM+ 10% FBS에서 배양된 인간의 지방 세포

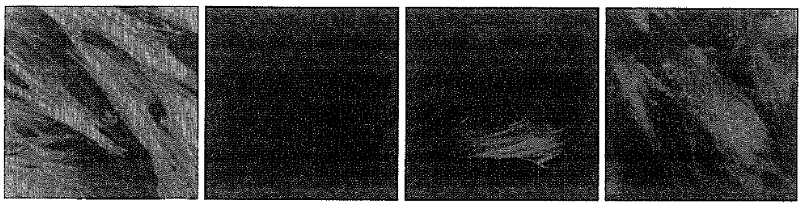
DMEM과 10% FBS에서 배양된 인간의 방광 평활근 세포

도면18



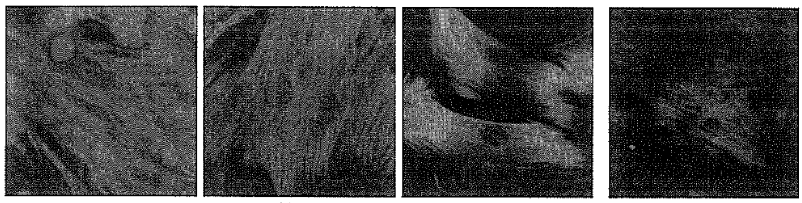
도면19

돼지 지방



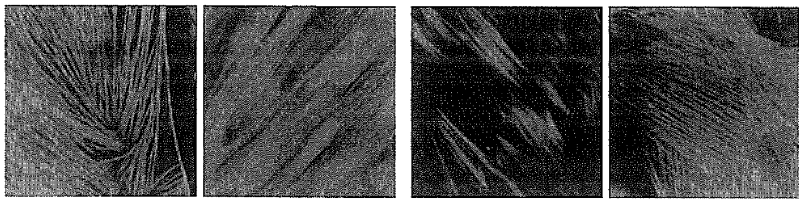
평활근 알파-액틴 SM22 칼포닌 마이오신 중쇄

돼지의 말초 혈액



평활근 알파-액틴 SM22 칼포닌 마이오신 중쇄

돼지 방광 평활근

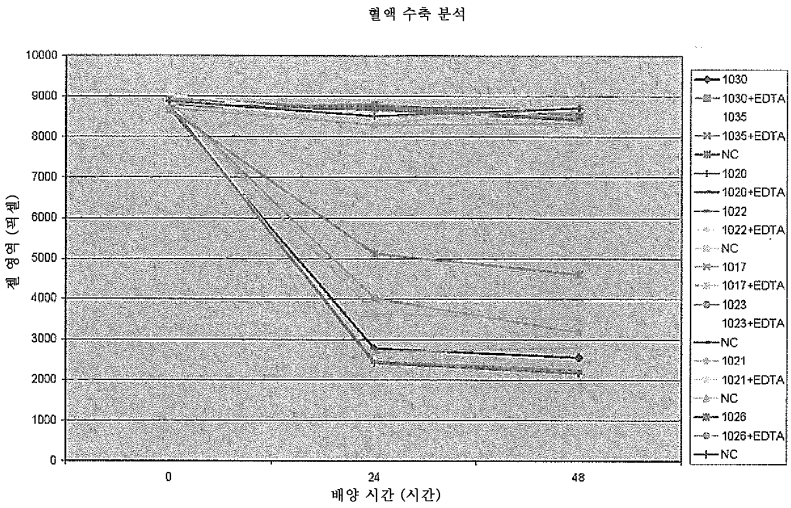


평활근 알파-액틴 SM22 칼포닌 마이오신 중쇄

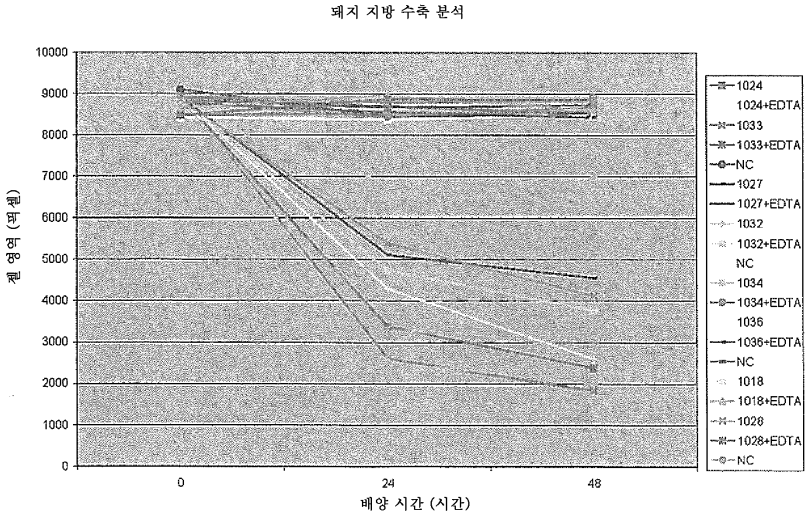
도면20


인간 혈액 MPCp5
SMA-알파 (녹색)
DAPI (파랑)
인간 혈액 MPCp1
SMA-알파 (녹색)
CNN1 (빨강)
DAPI (파랑)
인간 혈액 MPCp5
SM22 (빨강)
DAPI (파랑)
인간 혈액 MPCp5
CNN1 (빨강)
DAPI (파랑)

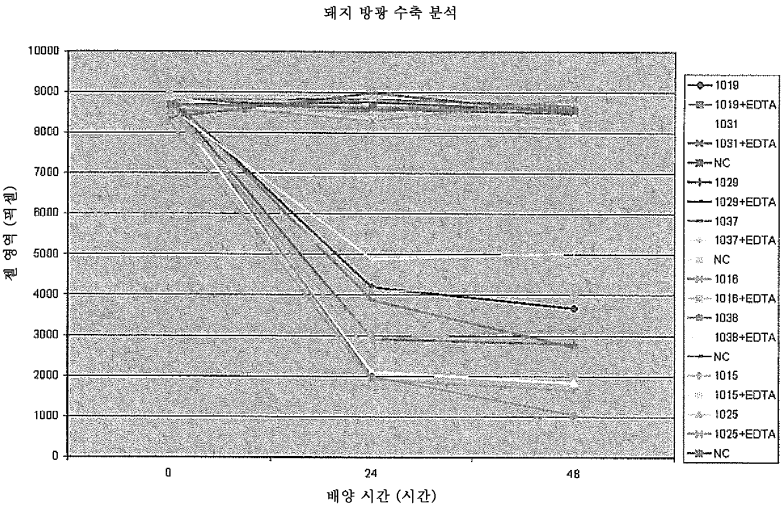
도면21a


혈액 수축 분석
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
겔 영역 (픽셀)
0
24
48
배양 시간 (시간)
1030
1030+EDTA
1035
1035+EDTA
NC
1020
1020+EDTA
1022
1022+EDTA
NC
1017
1017+EDTA
1023
1023+EDTA
NC
1021
1021+EDTA
NC
1026
1026+EDTA
NC

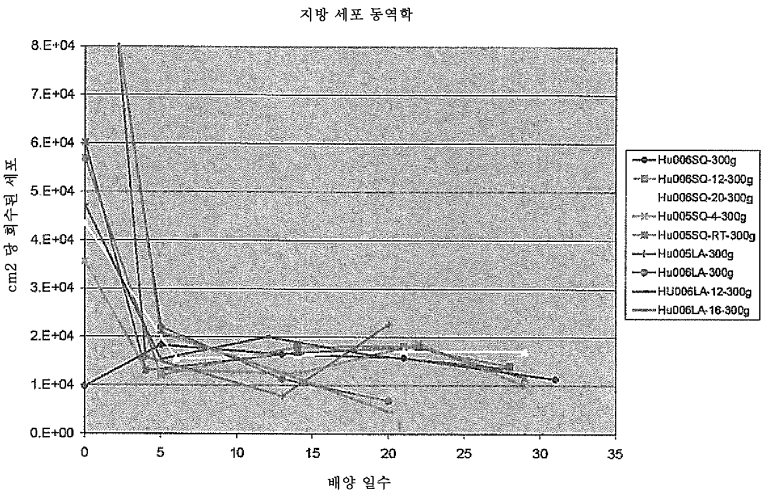
도면21b



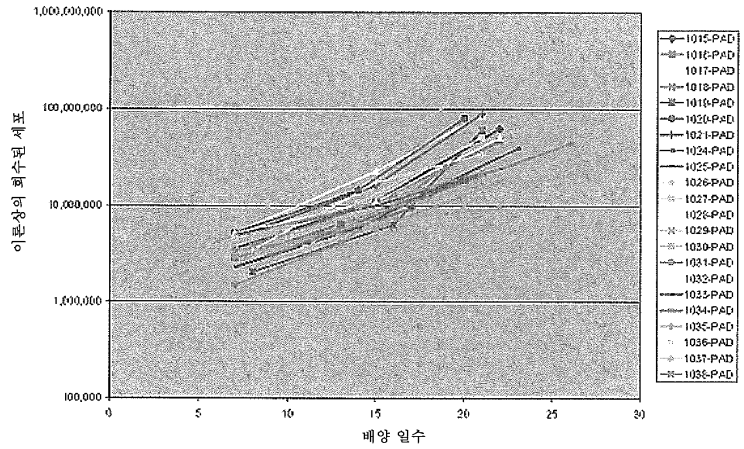

도면21c



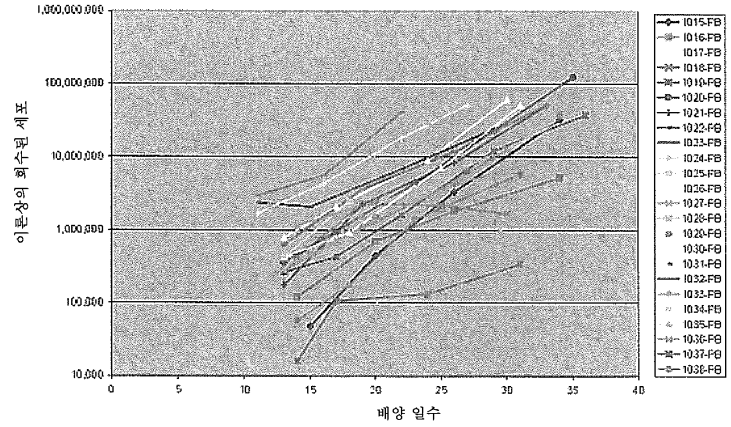

도면22



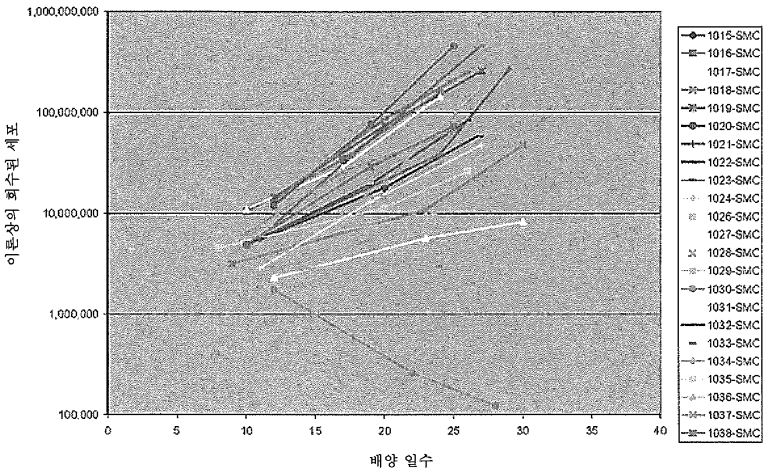
도면23a



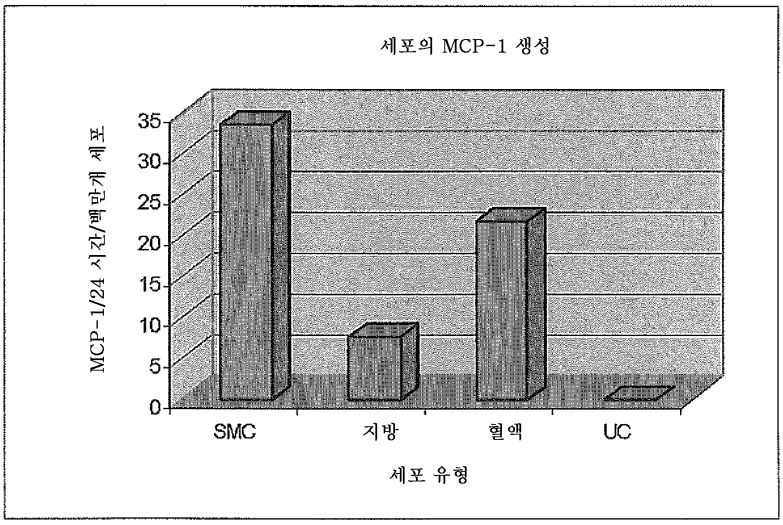

도면23b



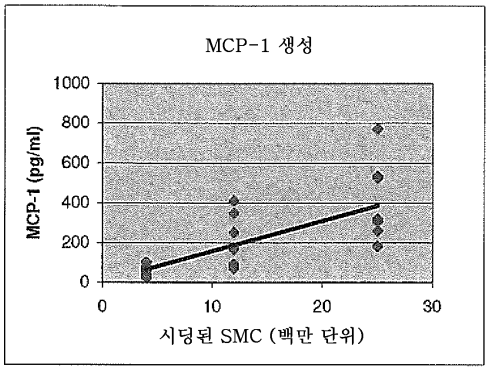

도면23c



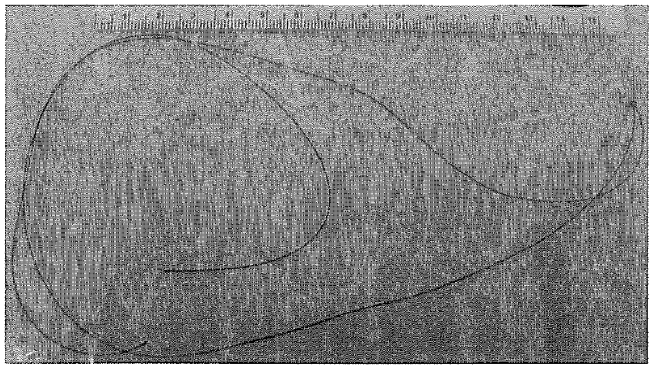
도면24



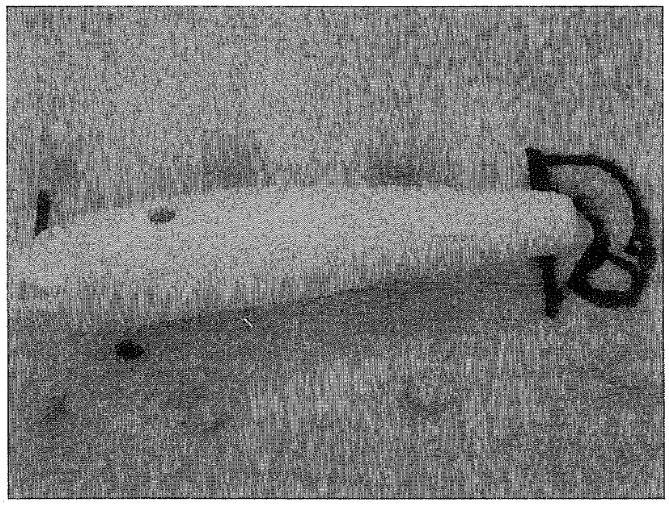

도면25



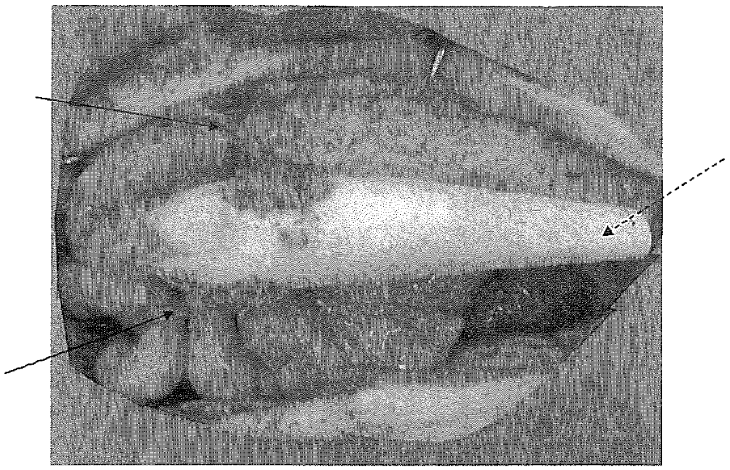

도면26



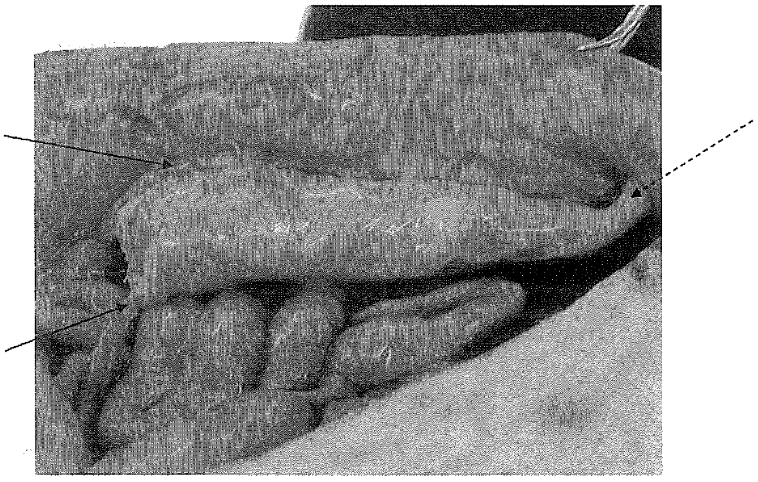
도면27



도면28



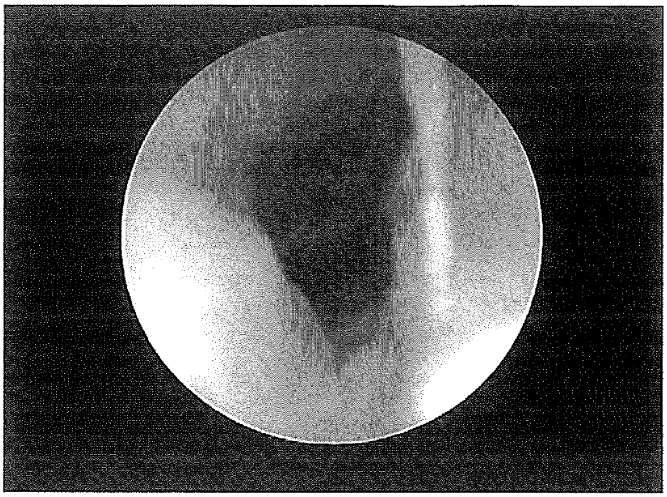
도면29



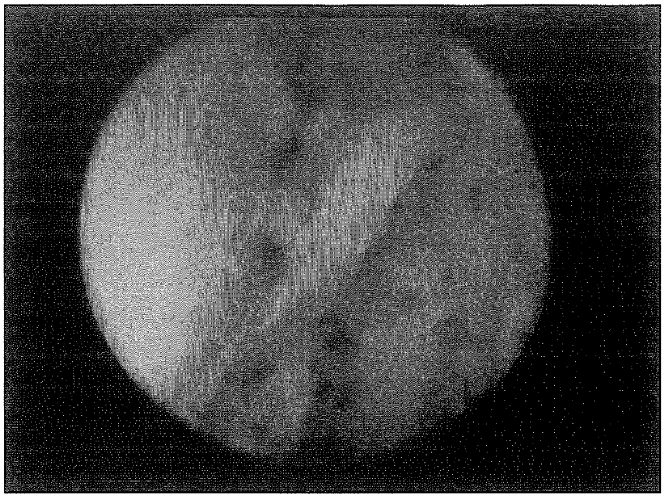
도면30



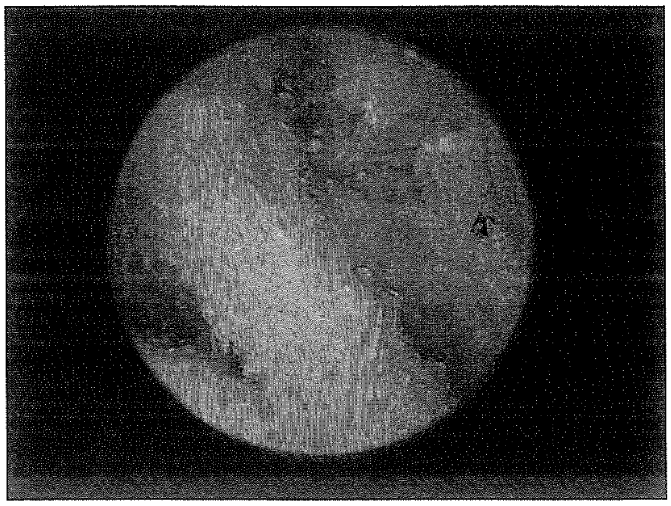
도면31



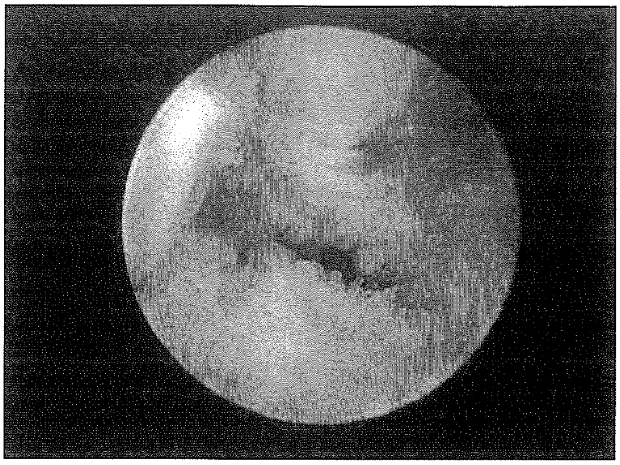
도면32



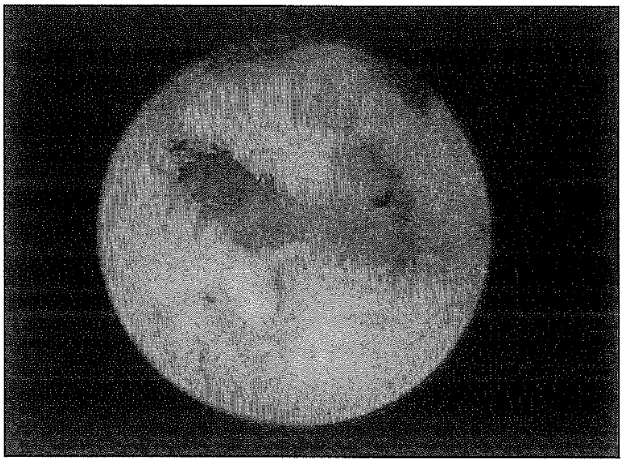
도면33



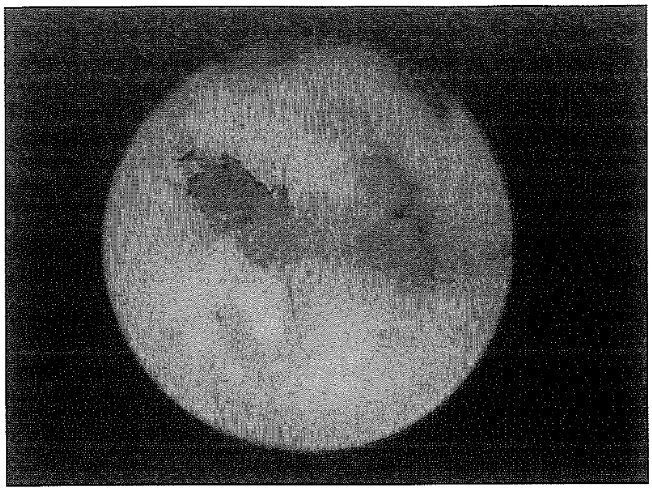
도면34



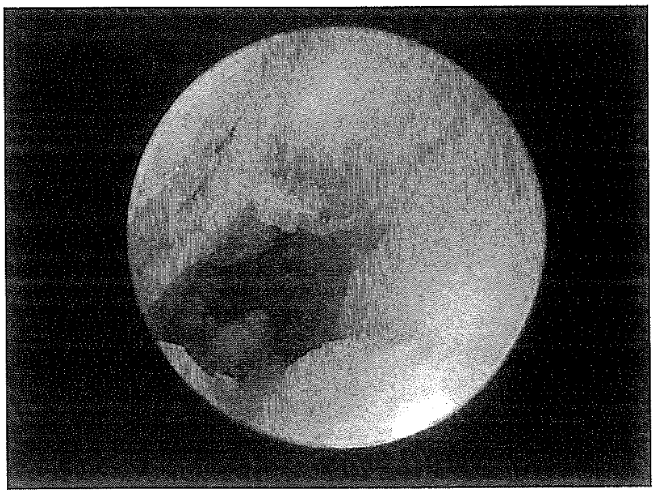
도면35



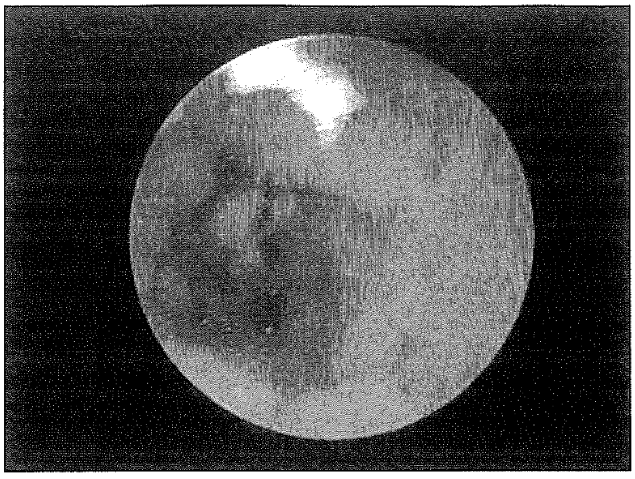
도면36



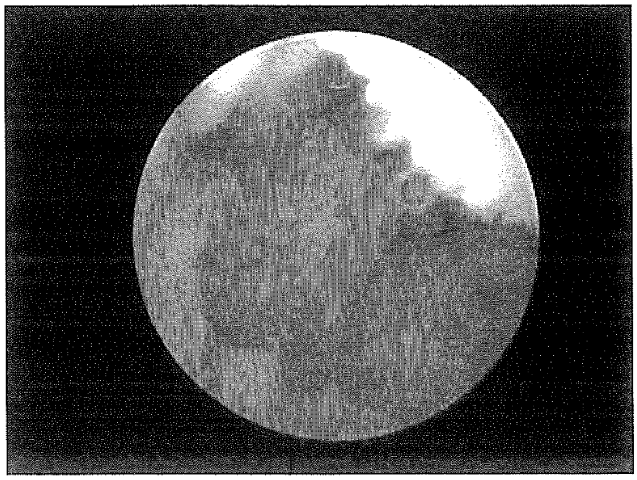
도면37



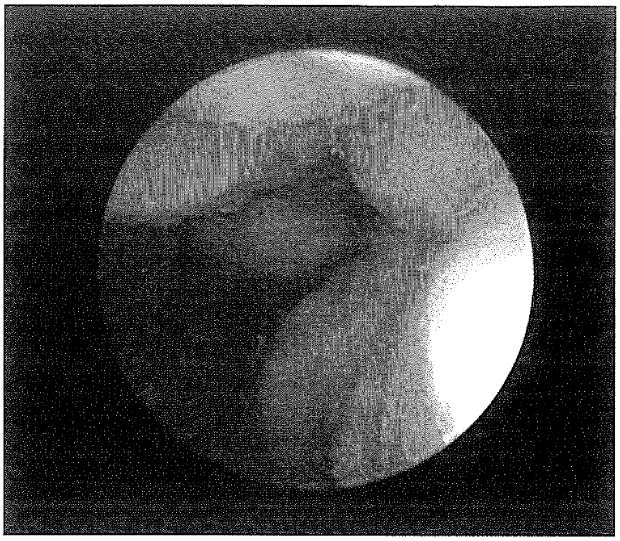
도면38



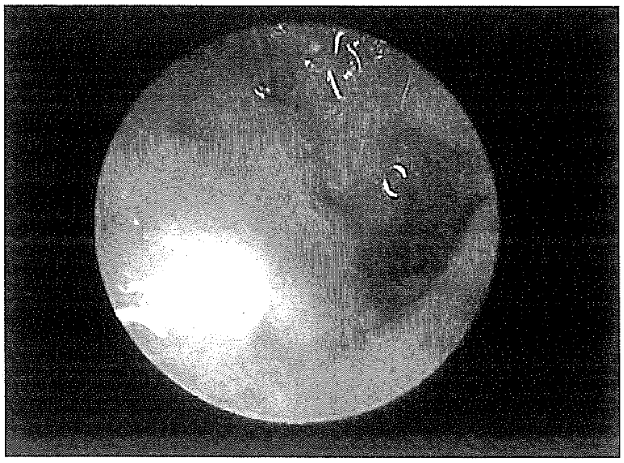
도면39



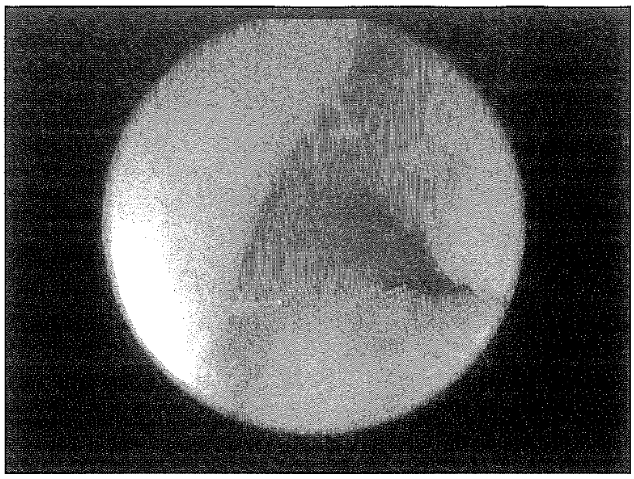
도면40



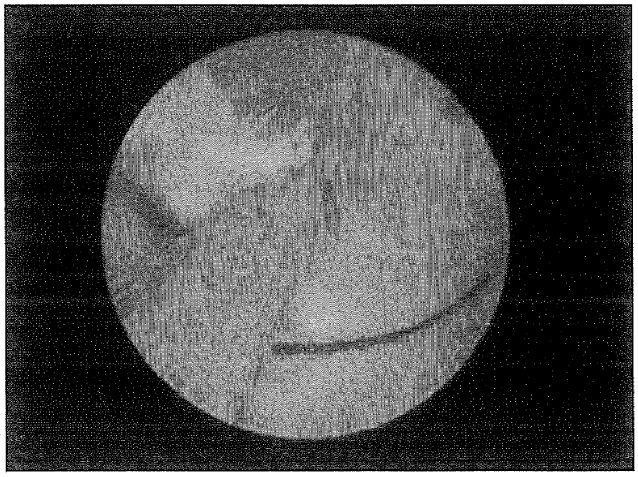
도면41



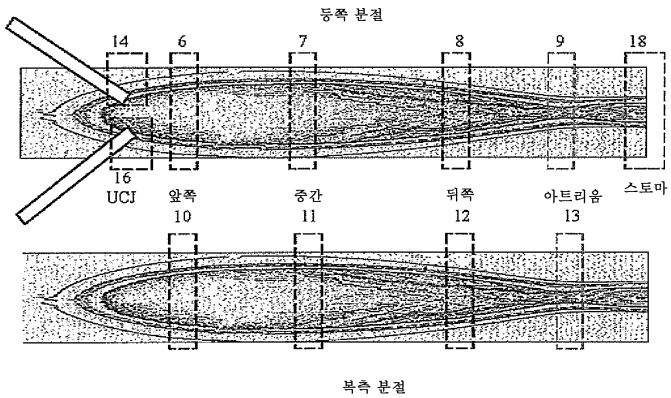
도면42



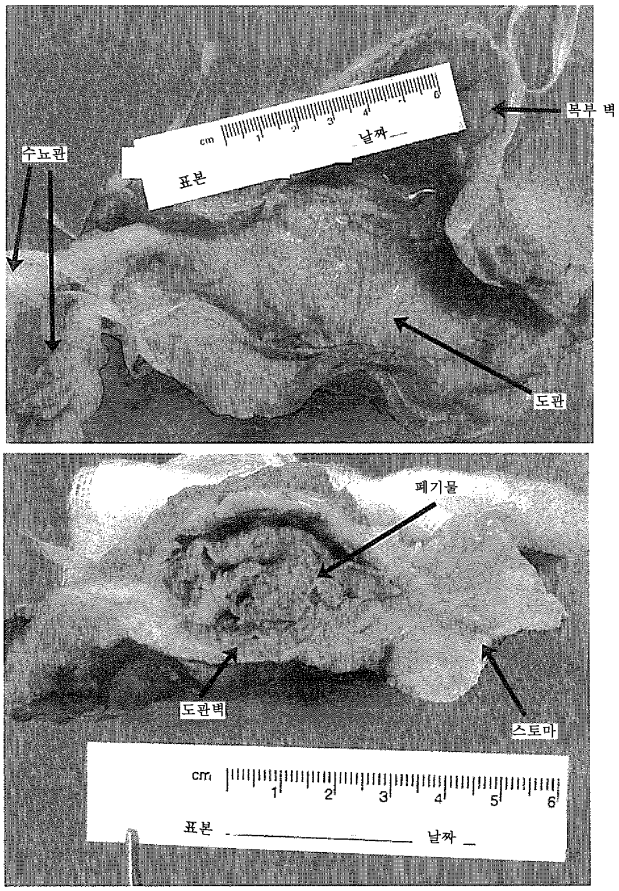
도면43



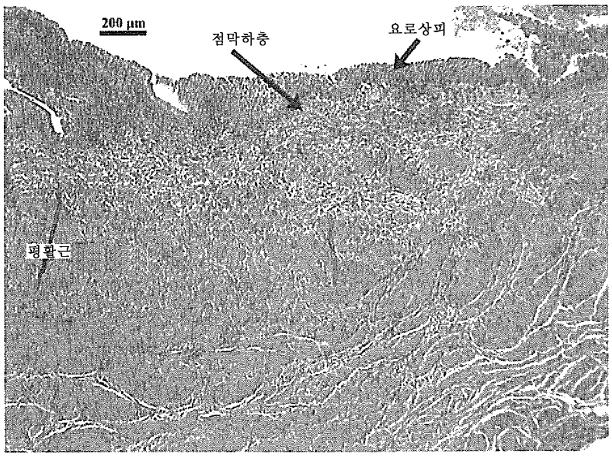
도면44



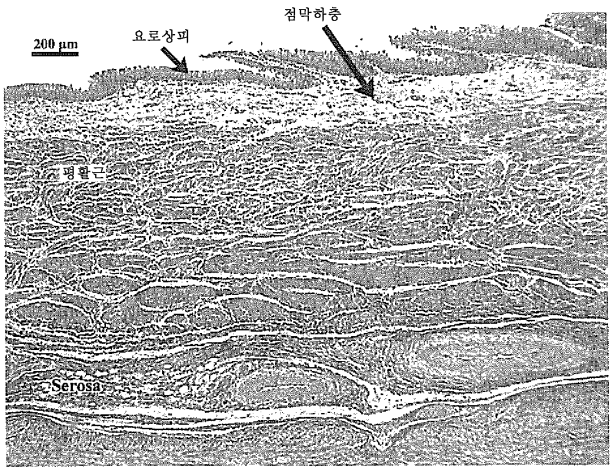
도면45



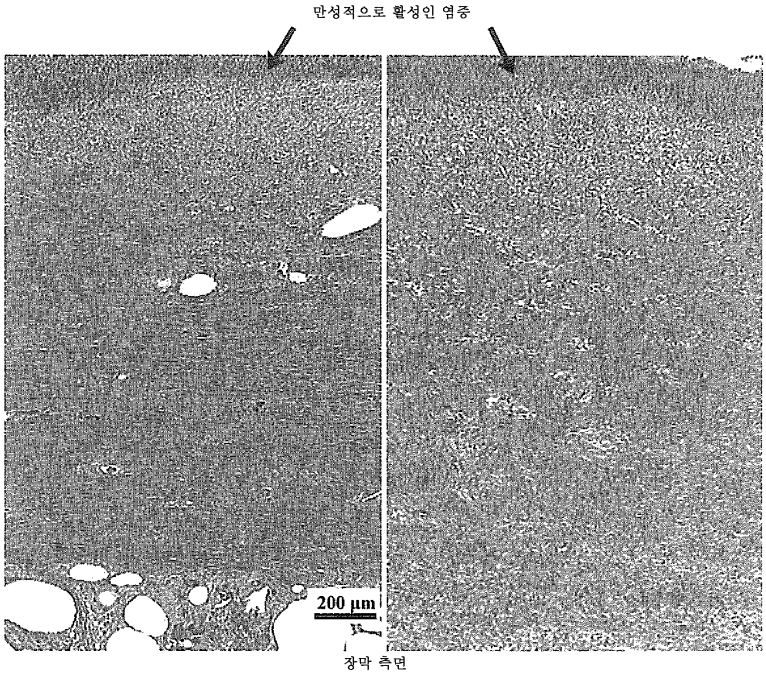

도면46



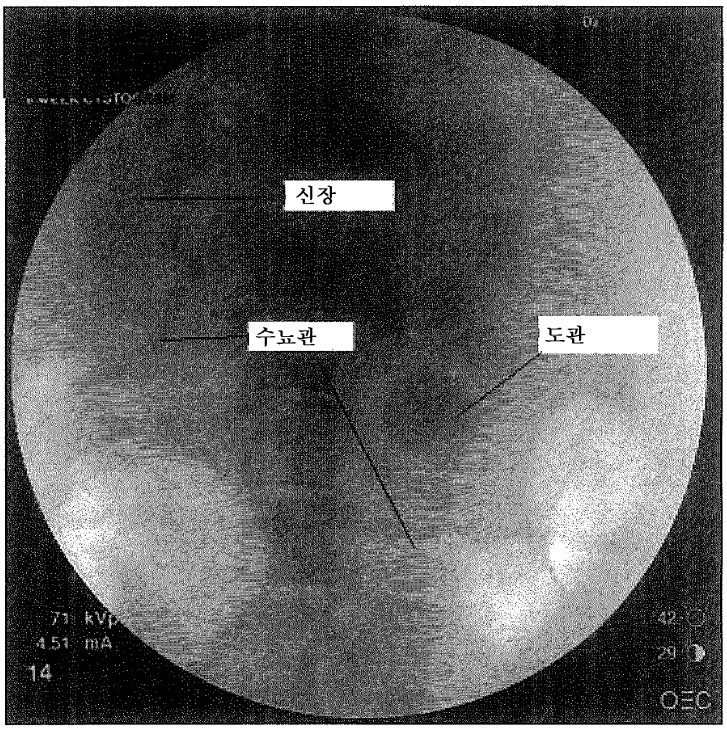
도면47



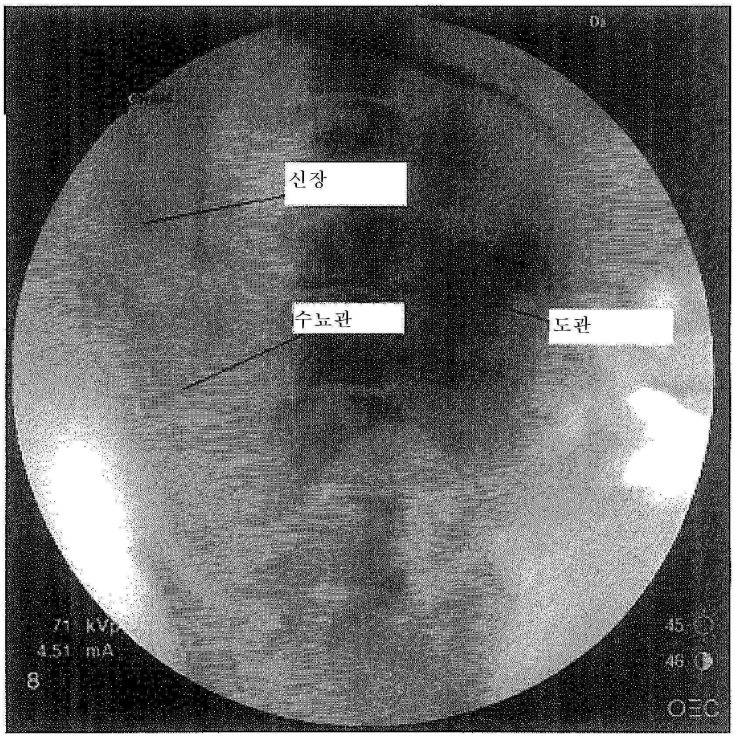

도면48



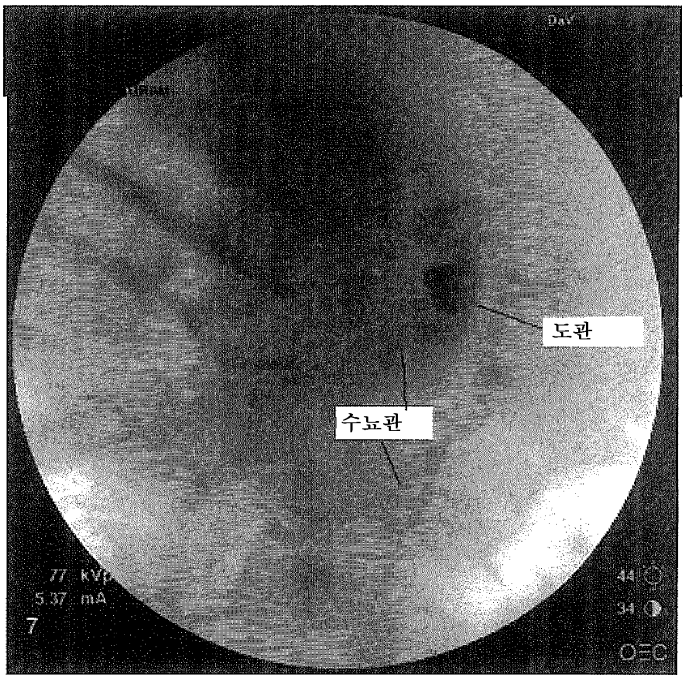
도면49a


신장
수뇨관
도관
71 kVp
4.51 mA
14
42
29
OEC

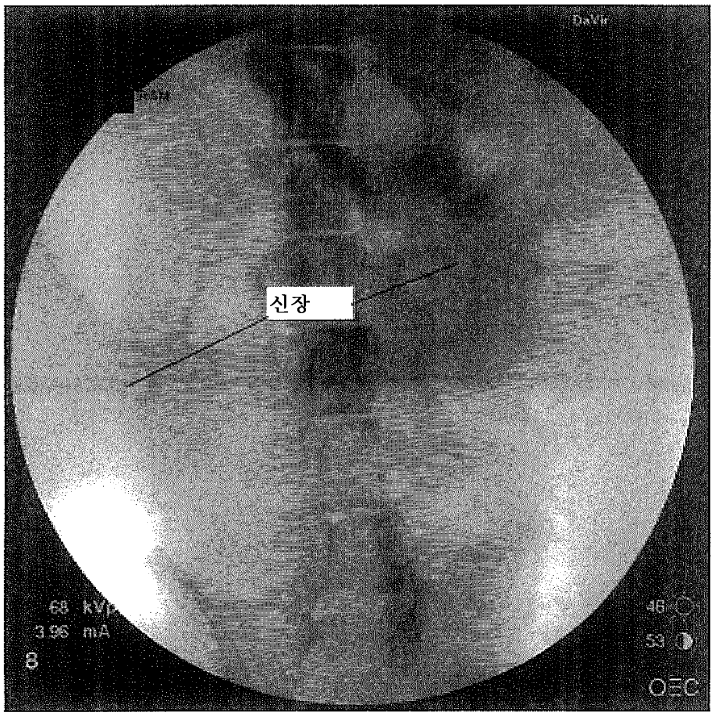
도면49b


신장
수뇨관
도관
71 kVp
4.51 mA
8
45
46
OEC

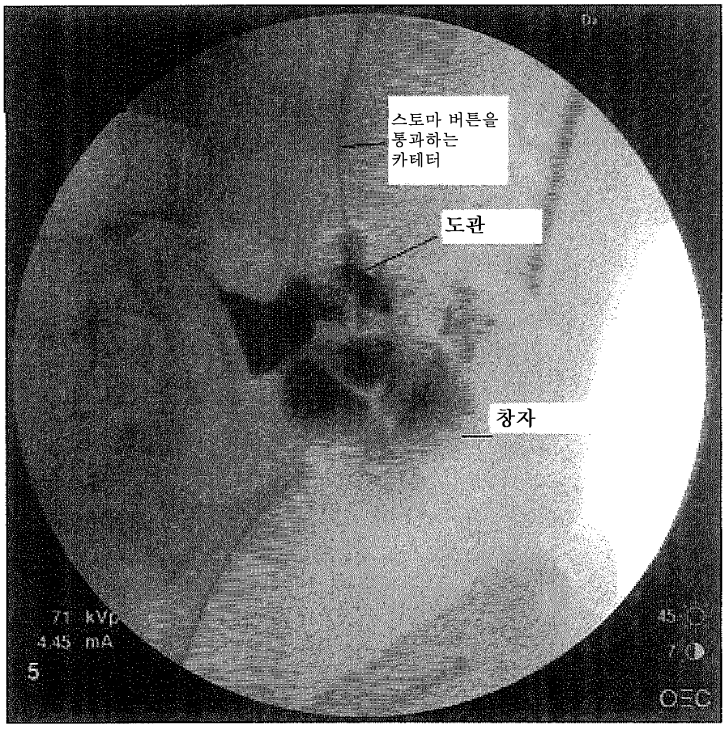
도면50a



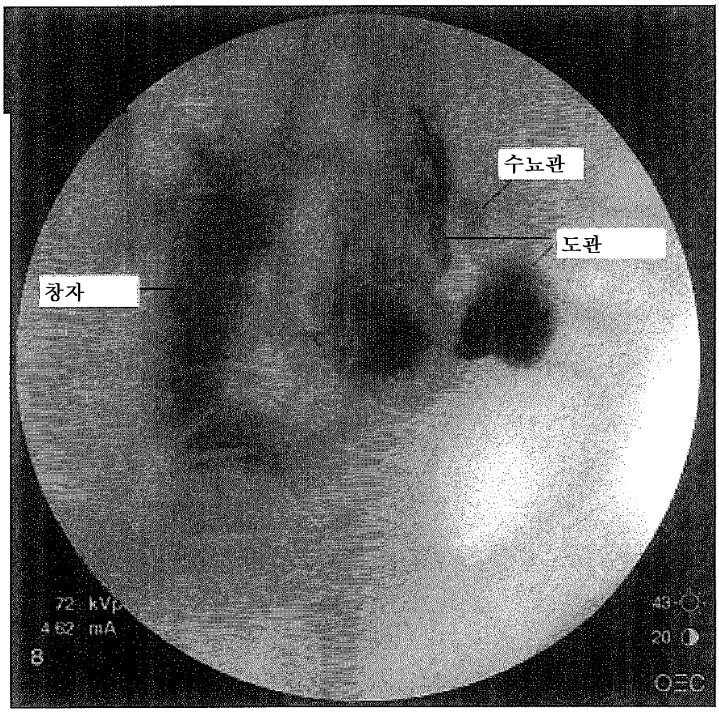

도면50b



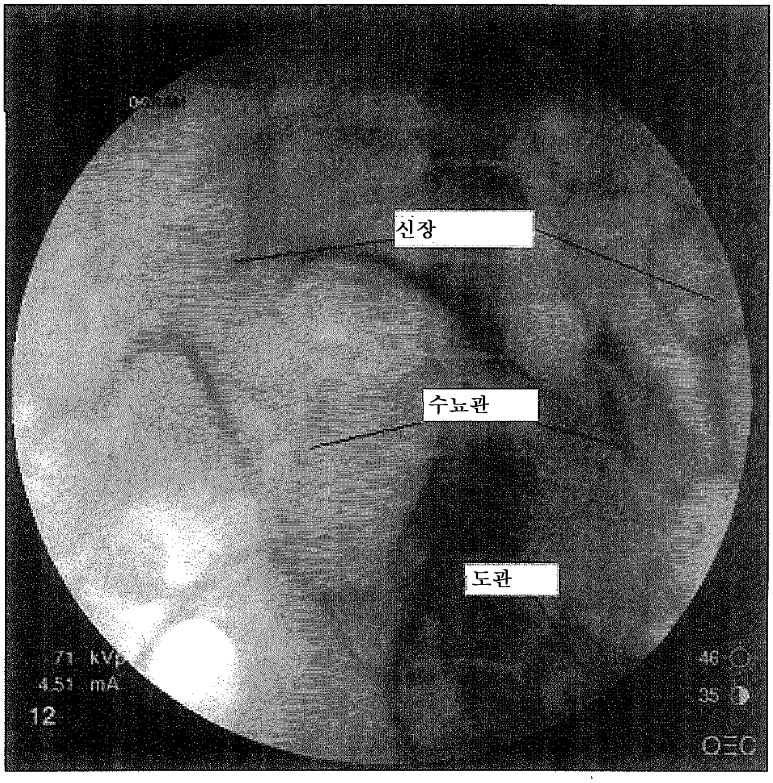
도면51


스토마 버튼을
통과하는
카테터
도관
창자
71 kVp
4.45 mA
5
45
7
OEC

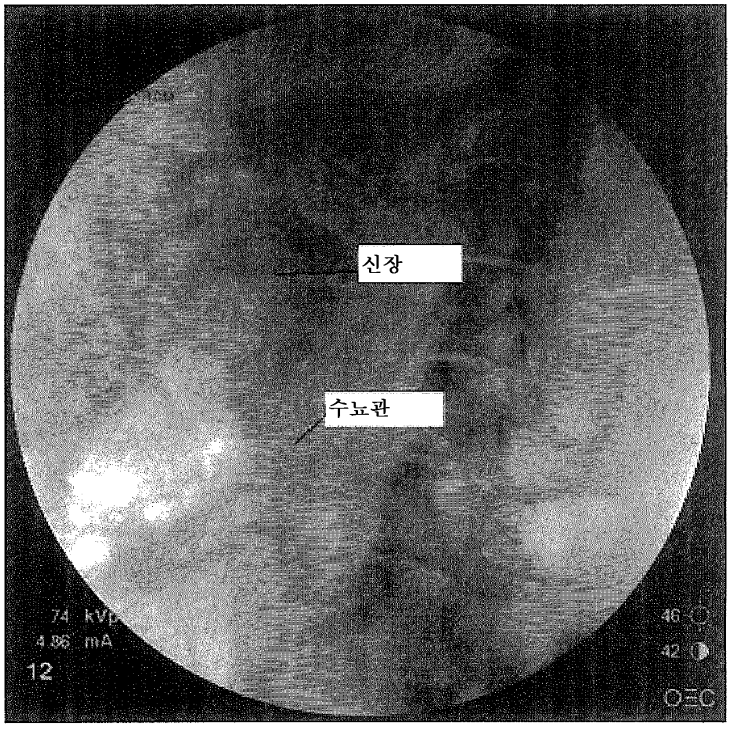
도면52


수뇨관
도관
창자
72 kVp
4.62 mA
8
43
20
OEC

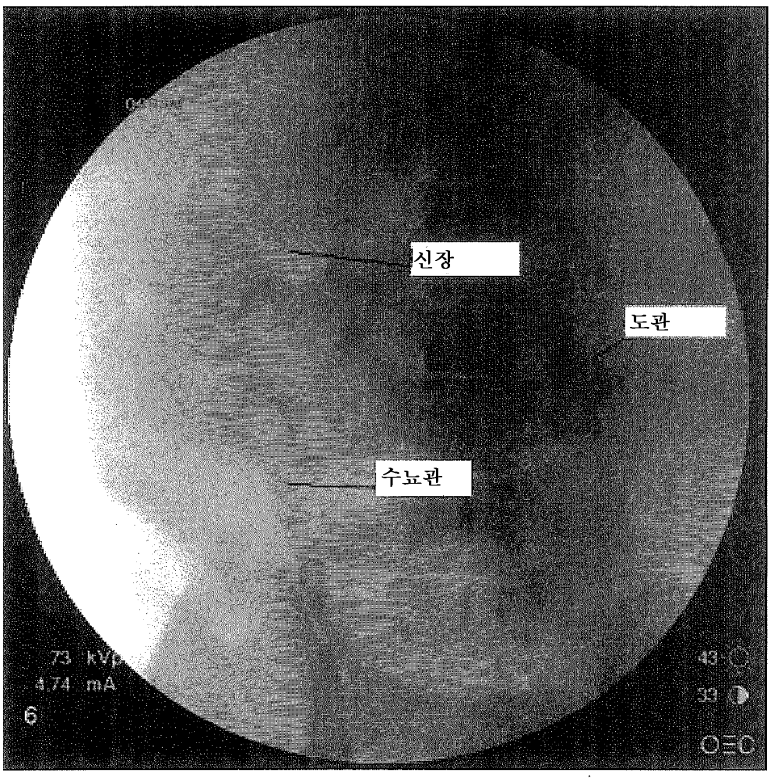
도면53


신장
수뇨관
도관
71 kVp
4.51 mA
12
46
35
OEC

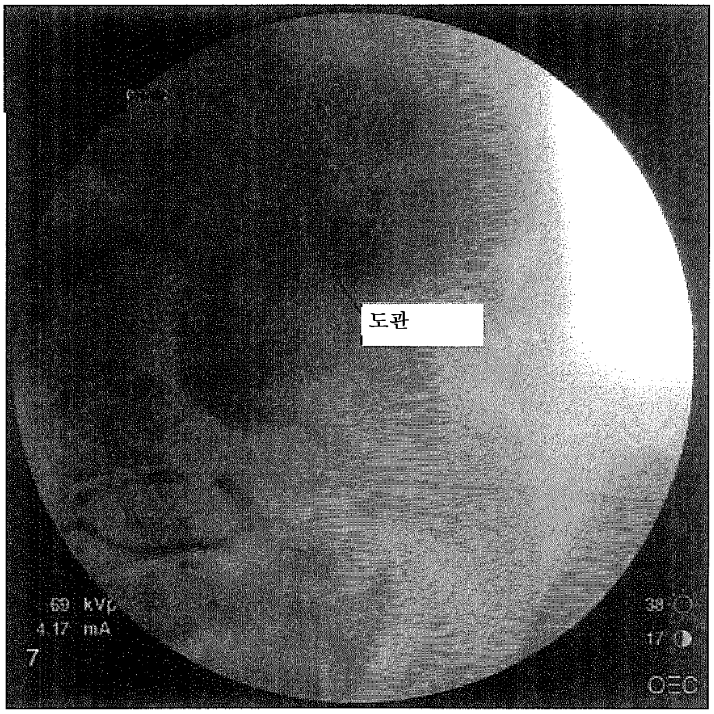
도면54


신장
수뇨관
74 kVp
4.86 mA
12
46
42
OEC

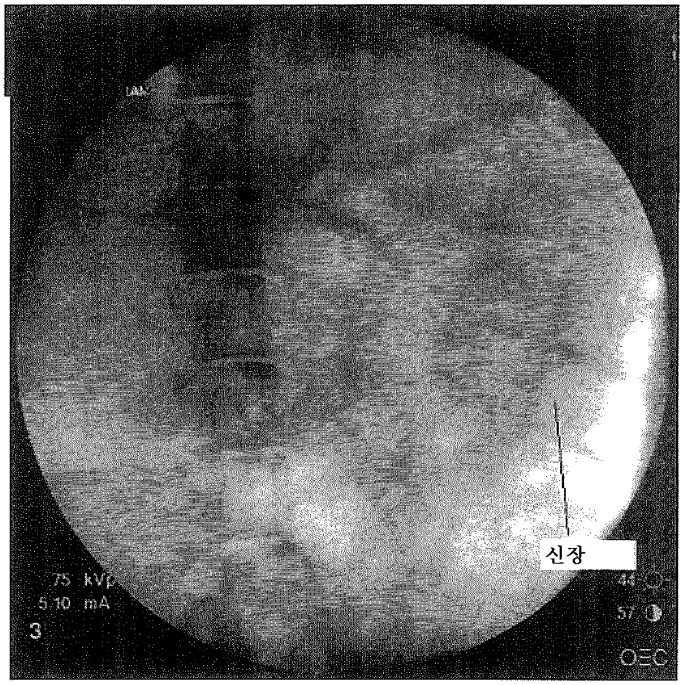
도면55a



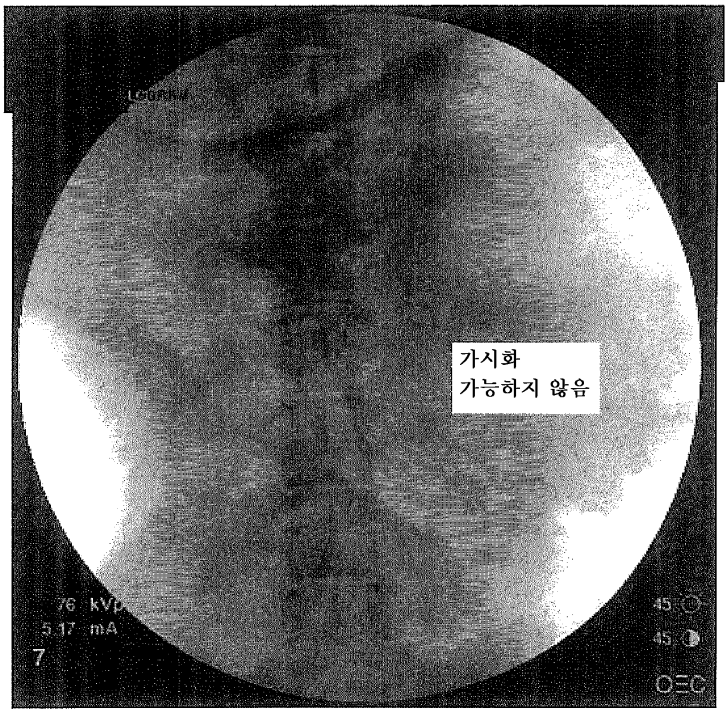

도면55b



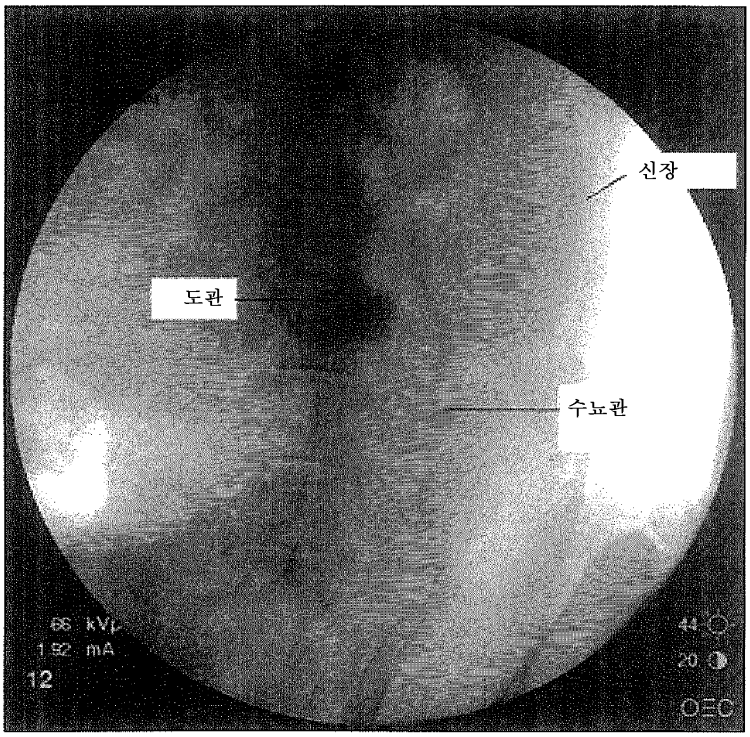
도면56a



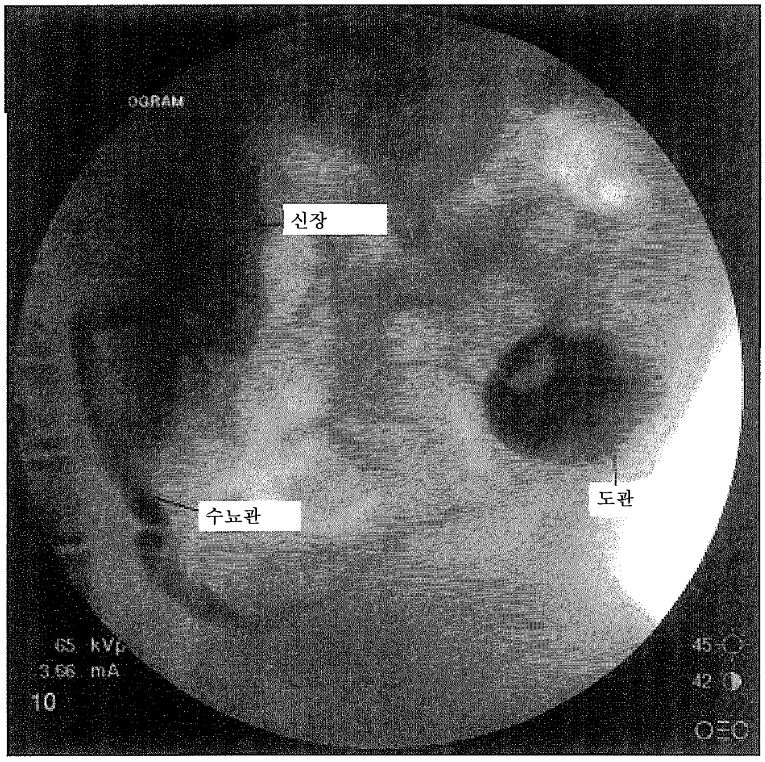

도면56b



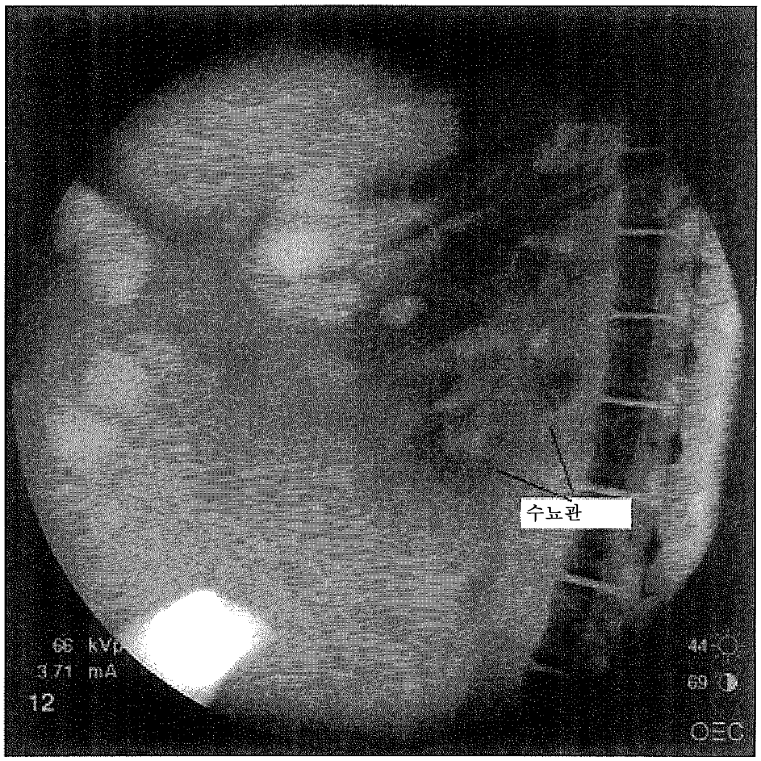
도면57a


신장
도관
수뇨관
66 kVp
1.92 mA
12
44
20
OEC

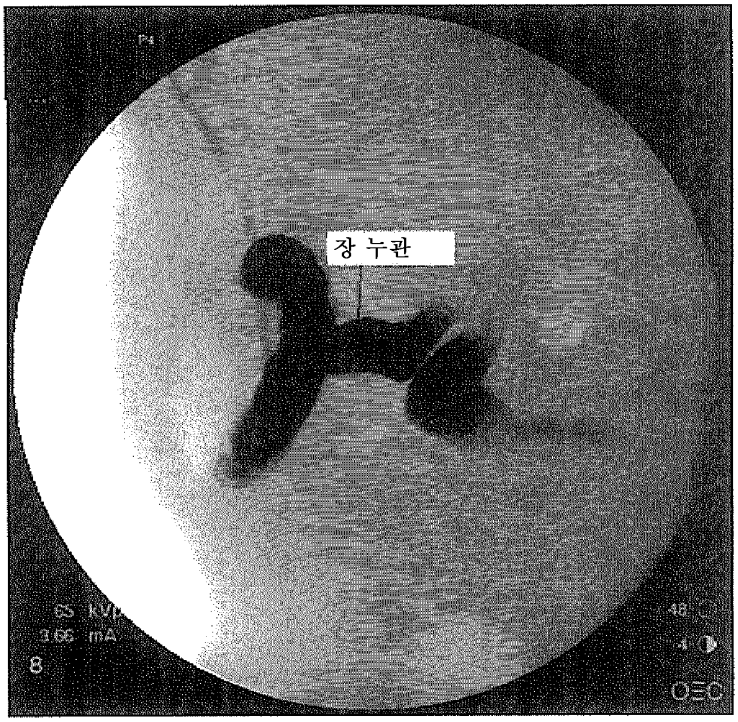
도면57b


DGRAM
신장
수뇨관
도관
65 kVp
3.66 mA
10
45
42
OEC

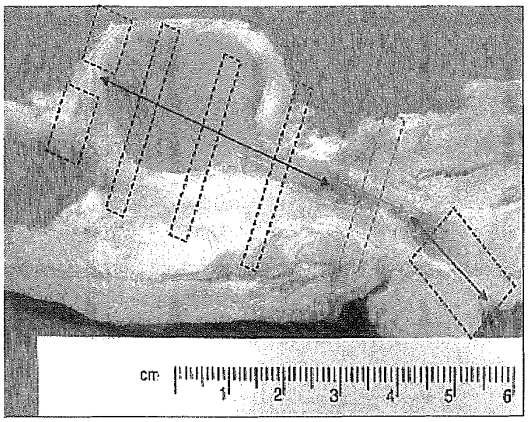
도면58a



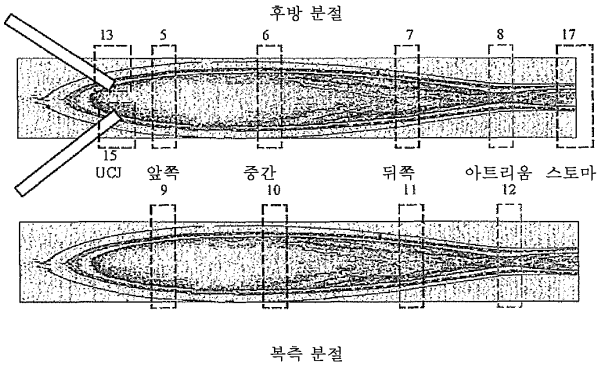

도면58b



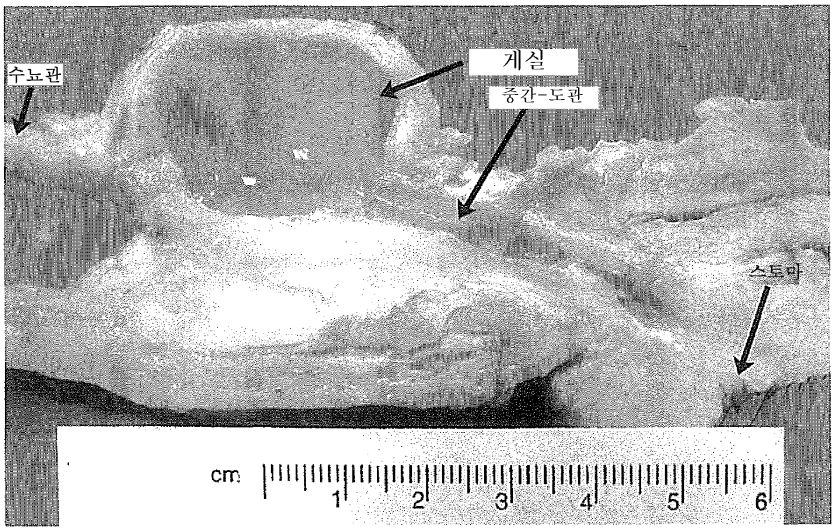
도면59a



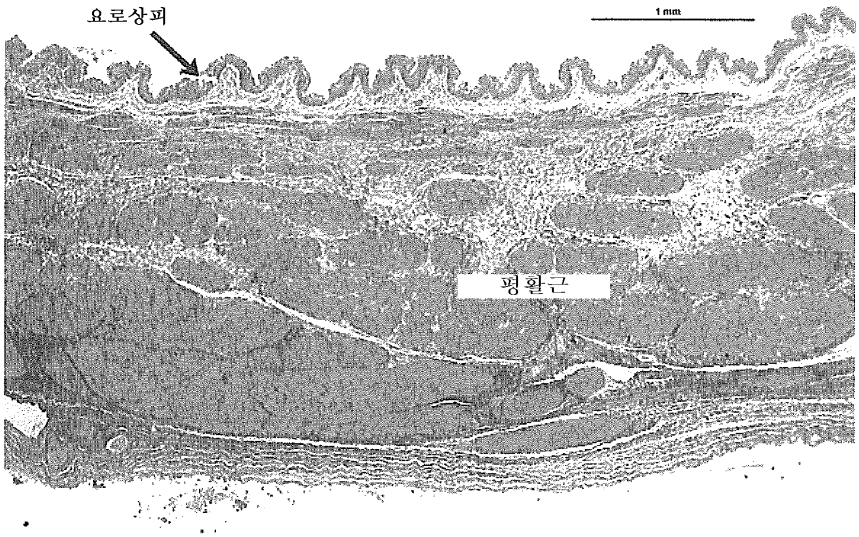

도면59b



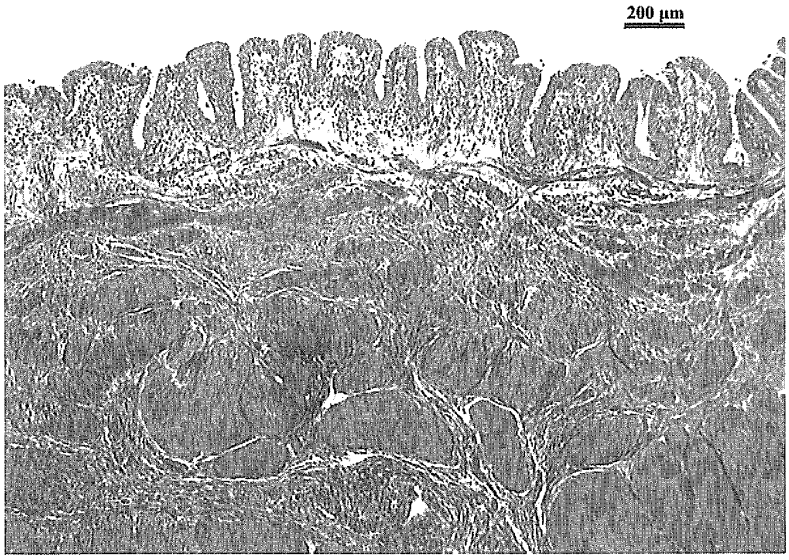

도면59c



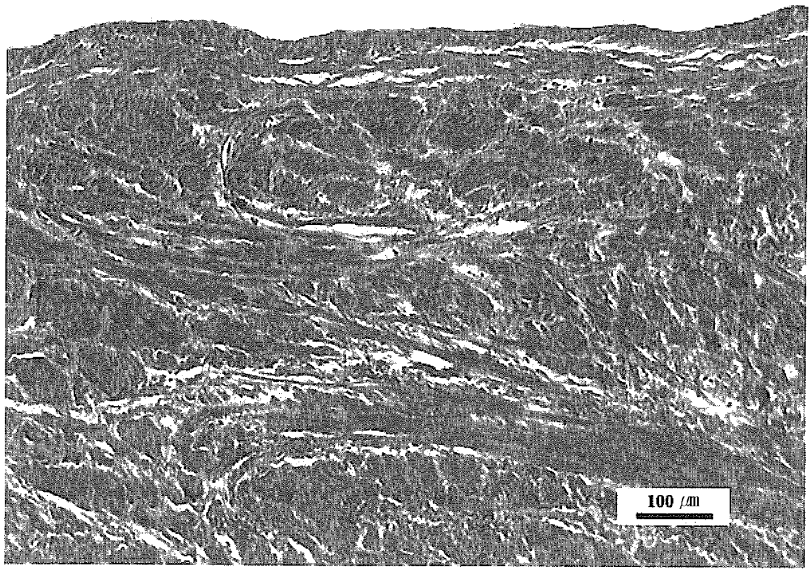
도면60



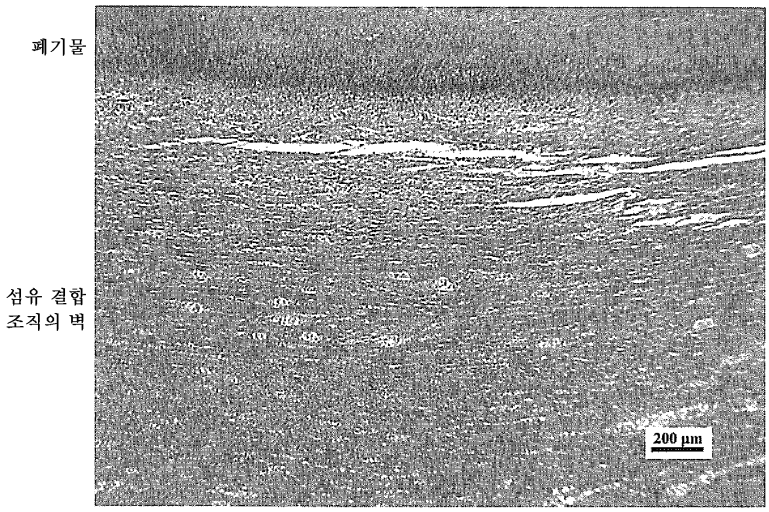

도면61



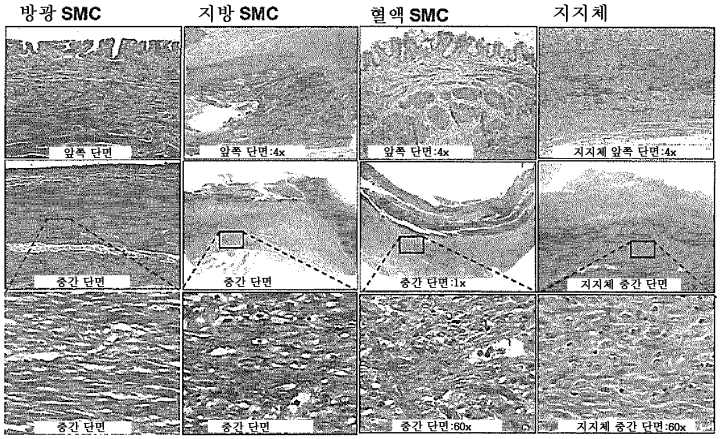
도면62



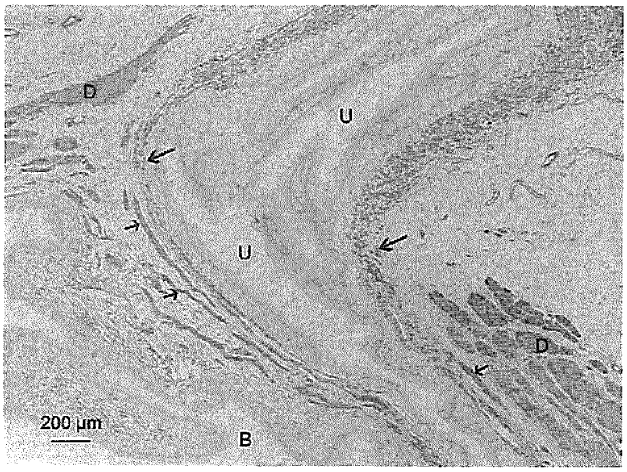

도면63



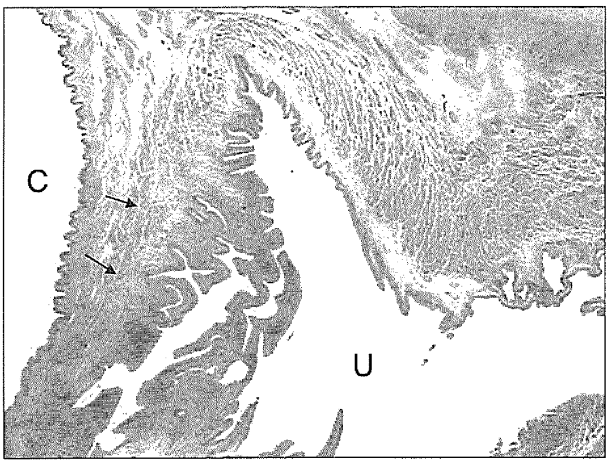
도면64



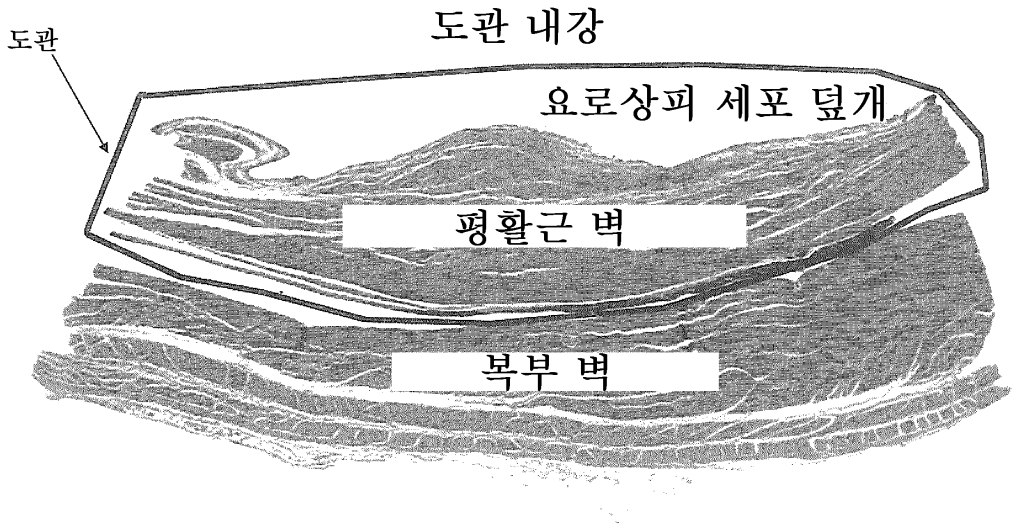

도면65




도면66

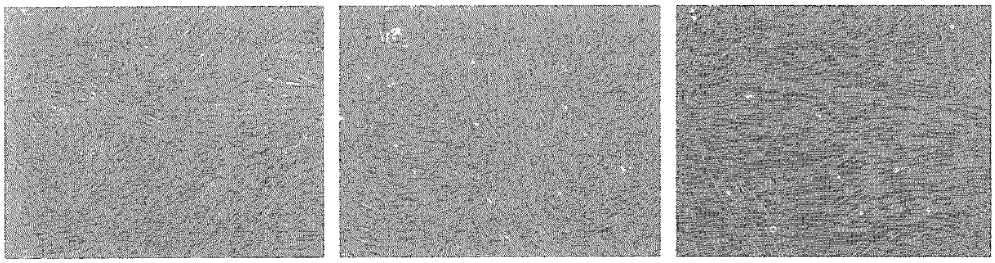


도면67




도면68

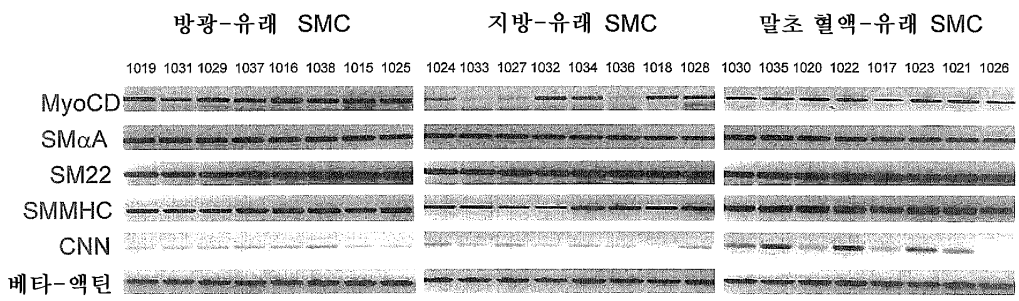
돼지의 방광, 지방 및 말초 혈액으로부터
평활근의 분리



A) 방광 B) 지방 C) 말초 혈액

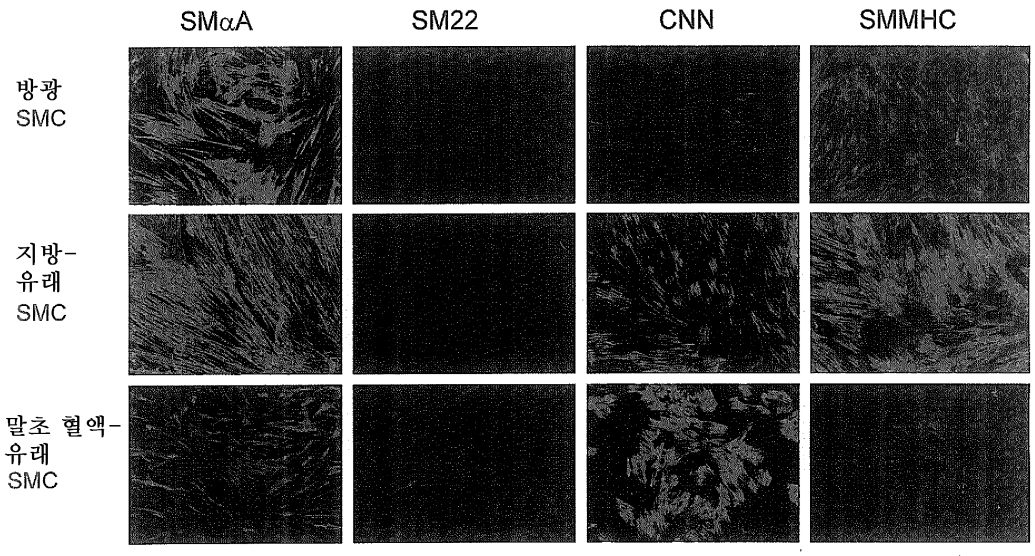
도면69

방광, 말초 혈액 또는 지방-유래 평활근 세포로부터
평활근 마커 발현의 RT-PCR 분석



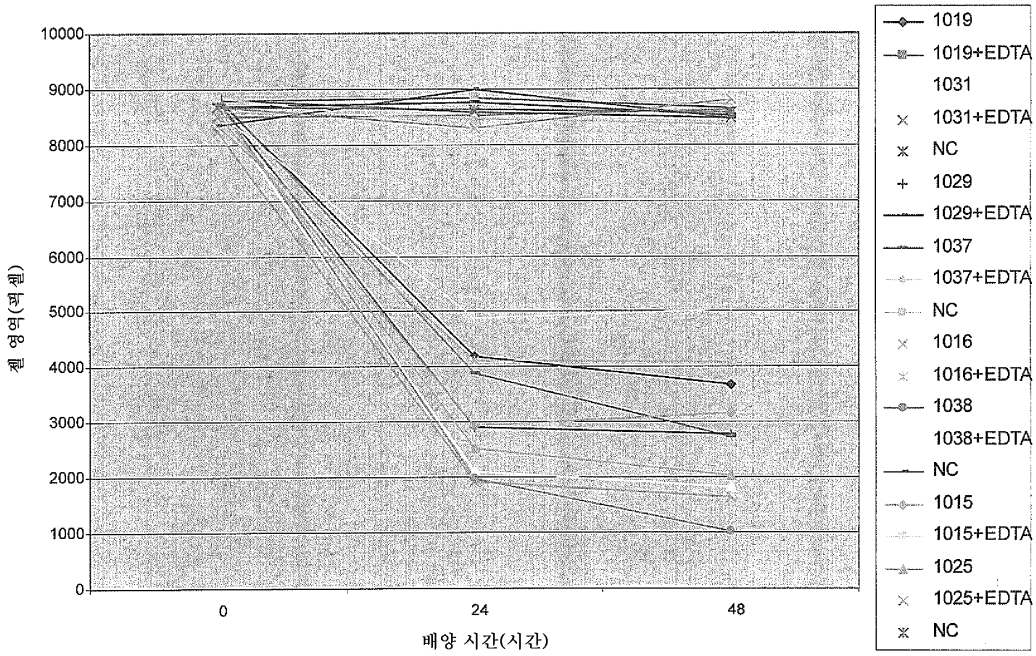
도면70

돼지의 방광, 지방 및 말초 혈액-유래의 평활근 세포에서 평활근 마커 발현의 면역-형광 분석

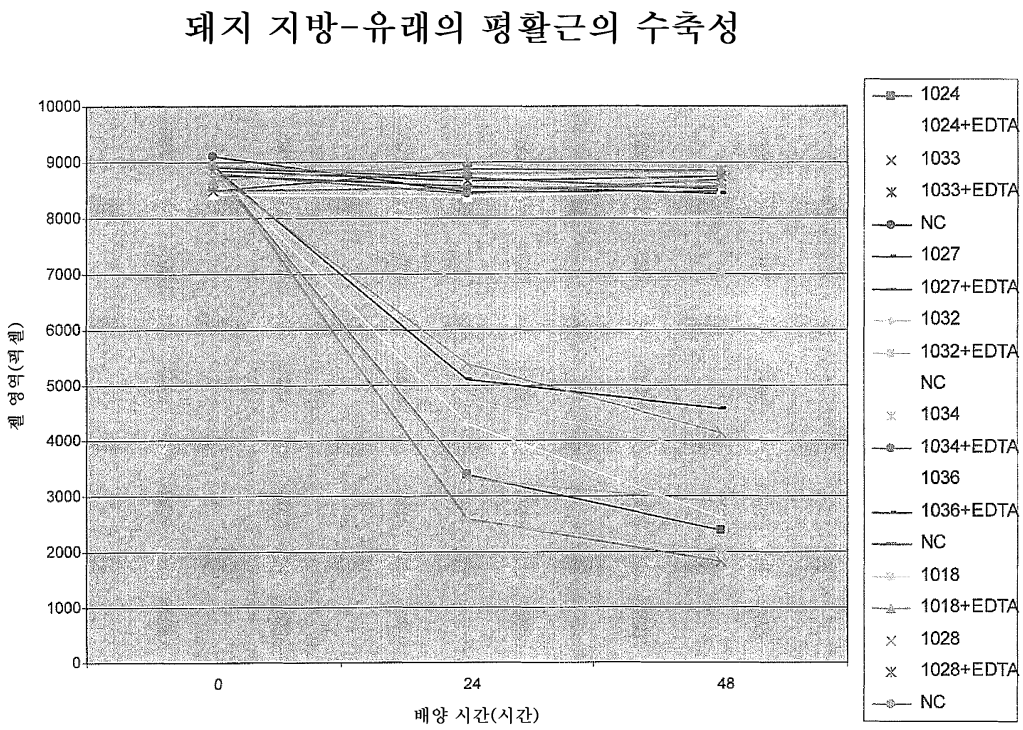



도면71a

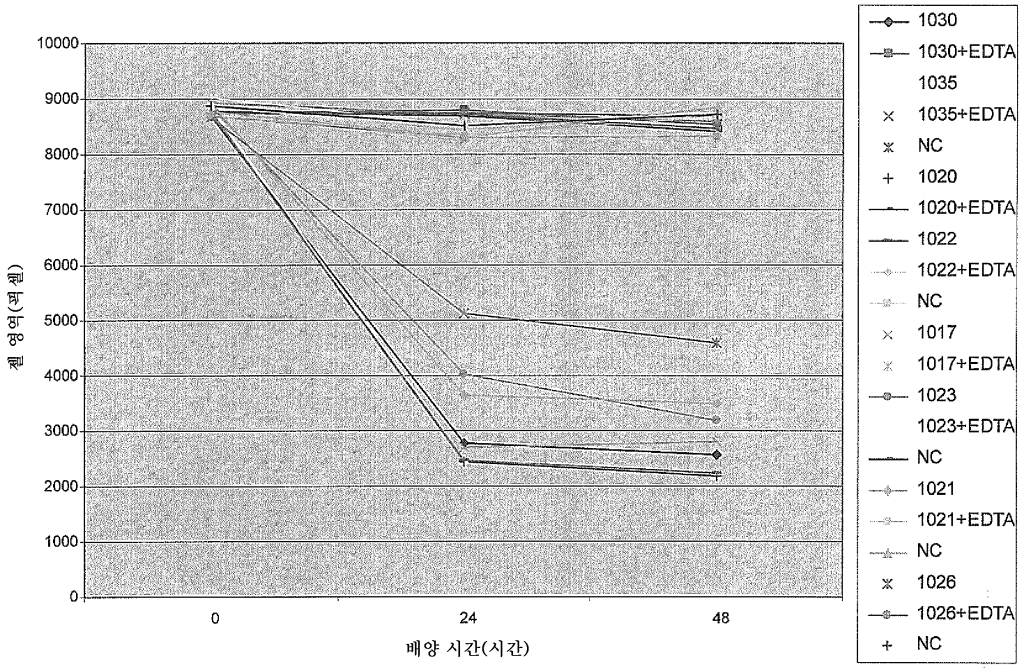
돼지 방광-유래의 평활근 세포의 수축성



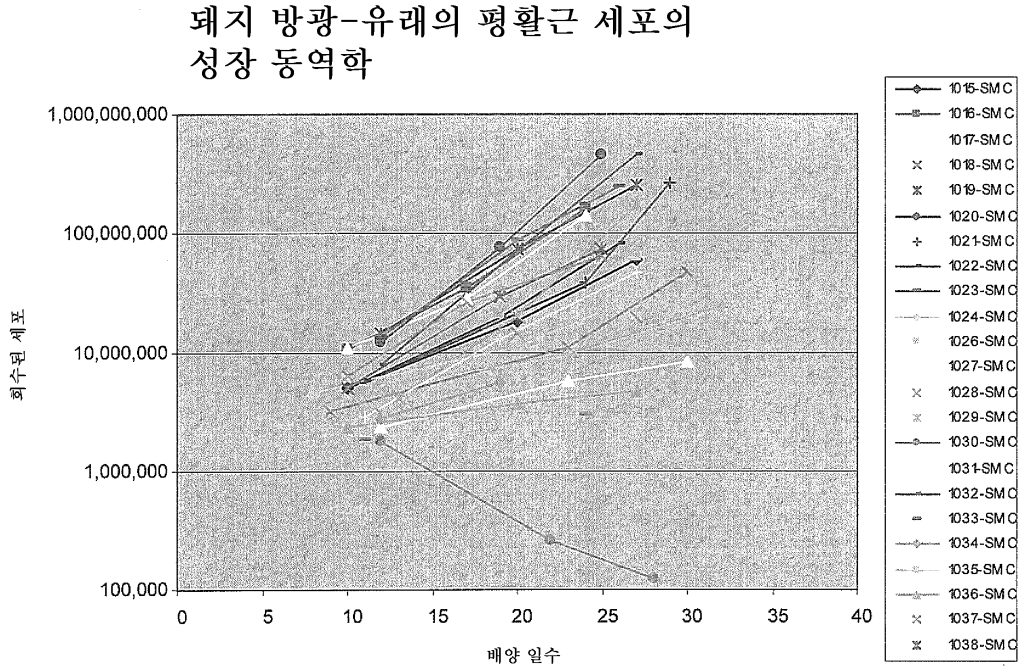
도면71b


돼지 지방-유래의 평활근의 수축성
셀 영역(픽셀)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
24
48
배양 시간(시간)
1024
1024+EDTA
1033
1033+EDTA
NC
1027
1027+EDTA
1032
1032+EDTA
NC
1034
1034+EDTA
1036
1036+EDTA
NC
1018
1018+EDTA
1028
1028+EDTA
NC

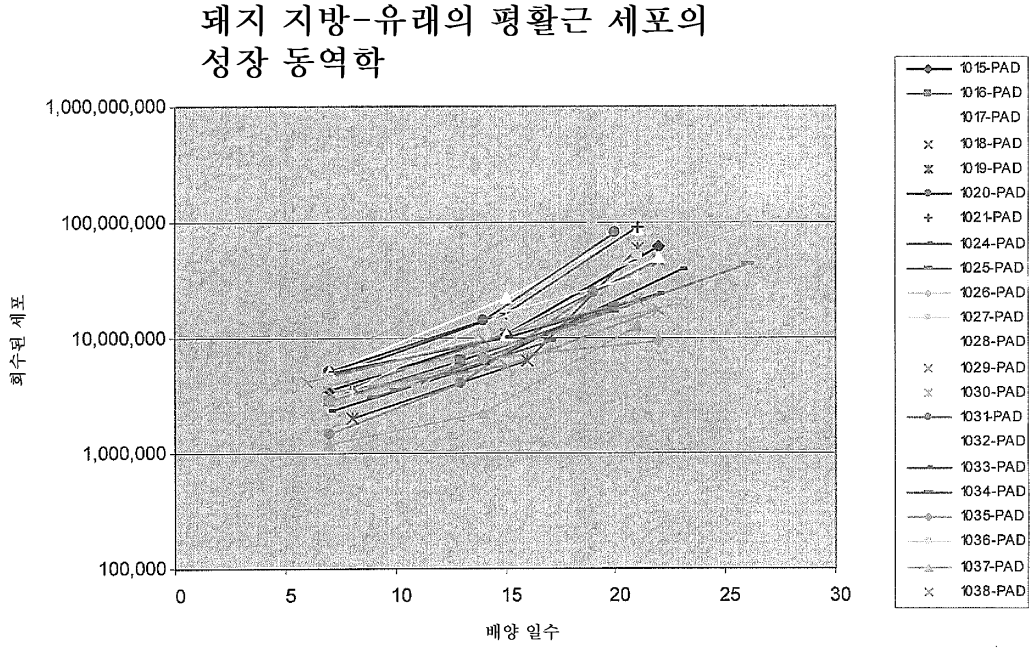
도면71c


돼지 말초 혈액-유래의 평활근 세포의 수축성
셀 영역(픽셀)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
24
48
배양 시간(시간)
1030
1030+EDTA
1035
1035+EDTA
NC
1020
1020+EDTA
1022
1022+EDTA
NC
1017
1017+EDTA
1023
1023+EDTA
NC
1021
1021+EDTA
NC
1026
1026+EDTA
NC

도면72a

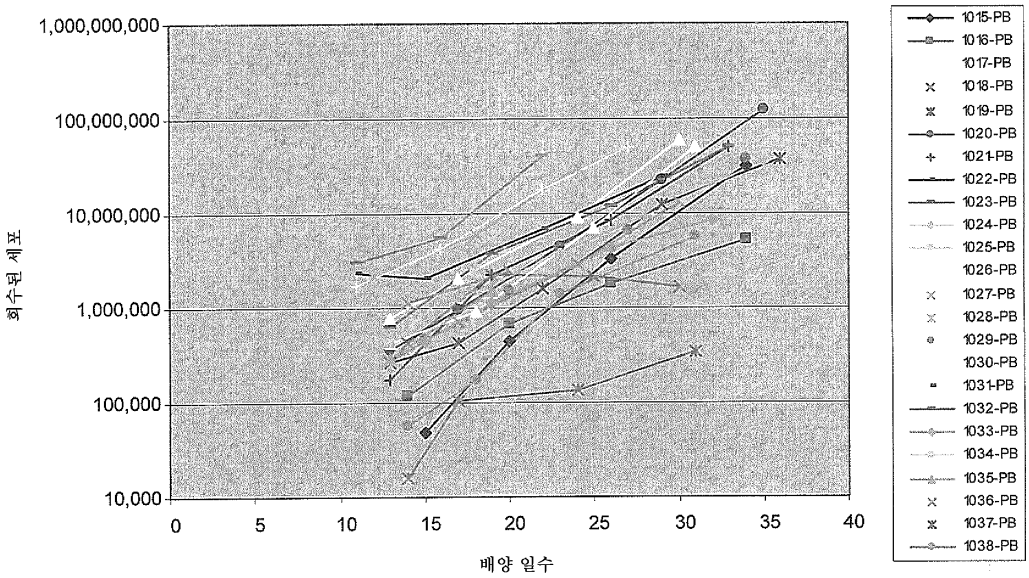

돼지 방광-유래의 평활근 세포의 성장 동역학
1,000,000,000
100,000,000
10,000,000
1,000,000
100,000
회수된 세포
0
5
10
15
20
25
30
35
40
배양 일수
1015-SMC
1016-SMC
1017-SMC
1018-SMC
1019-SMC
1020-SMC
1021-SMC
1022-SMC
1023-SMC
1024-SMC
1026-SMC
1027-SMC
1028-SMC
1029-SMC
1030-SMC
1031-SMC
1032-SMC
1033-SMC
1034-SMC
1035-SMC
1036-SMC
1037-SMC
1038-SMC

도면72b


돼지 지방-유래의 평활근 세포의 성장 동역학
1,000,000,000
100,000,000
10,000,000
1,000,000
100,000
회수된 세포
0
5
10
15
20
25
30
배양 일수
1015-PAD
1016-PAD
1017-PAD
1018-PAD
1019-PAD
1020-PAD
1021-PAD
1024-PAD
1025-PAD
1026-PAD
1027-PAD
1028-PAD
1029-PAD
1030-PAD
1031-PAD
1032-PAD
1033-PAD
1034-PAD
1035-PAD
1036-PAD
1037-PAD
1038-PAD

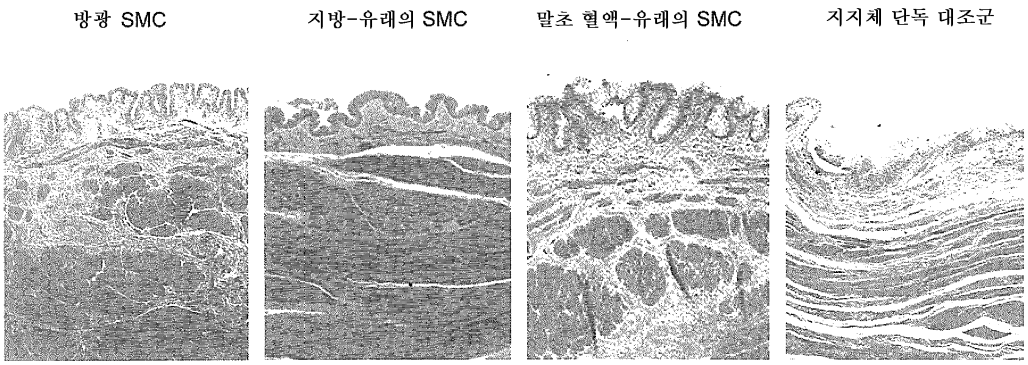
도면72c

돼지 말초 혈액-유래의 평활근 세포의 성장 동역학

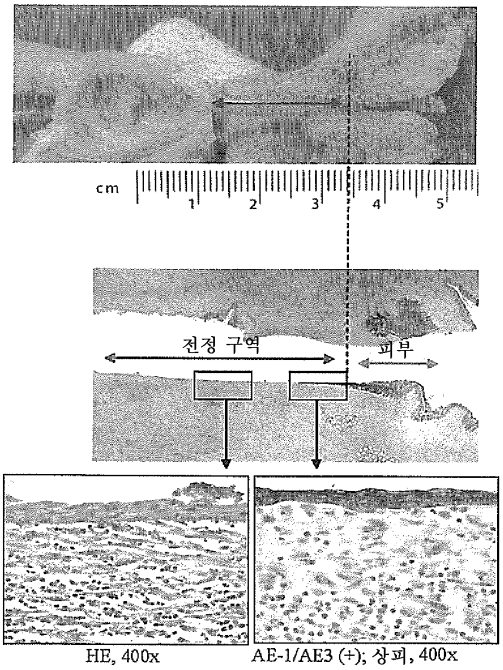



도면73

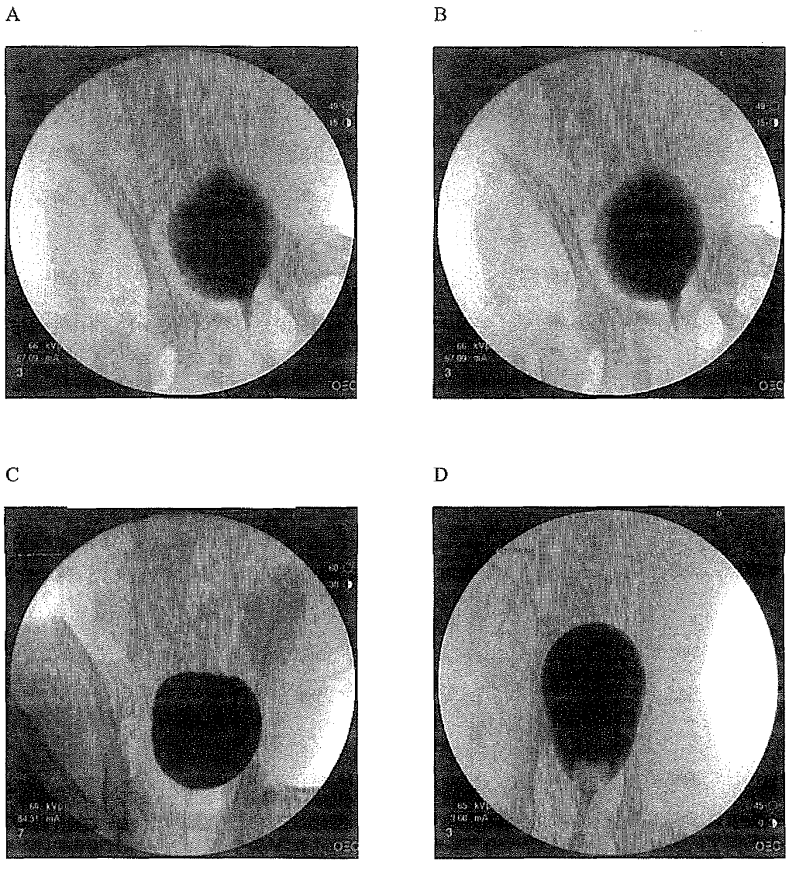
방광, 지방 & 말초 혈액-유래의 평활근 세포로 시딩 된 신-비뇨기 도관의 조직병리학



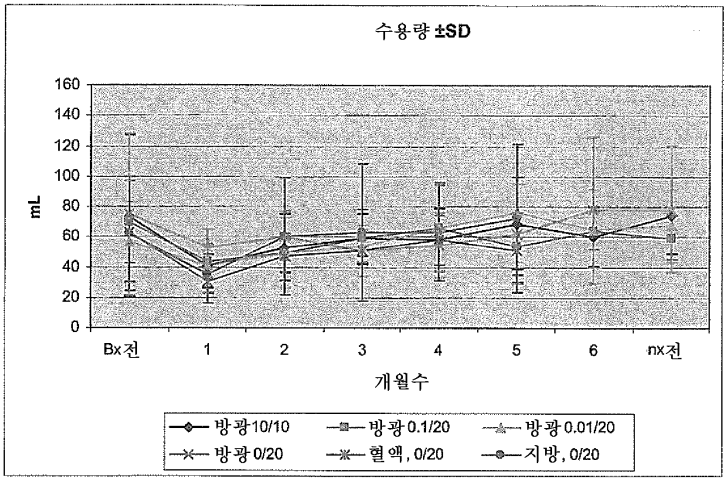
도면74



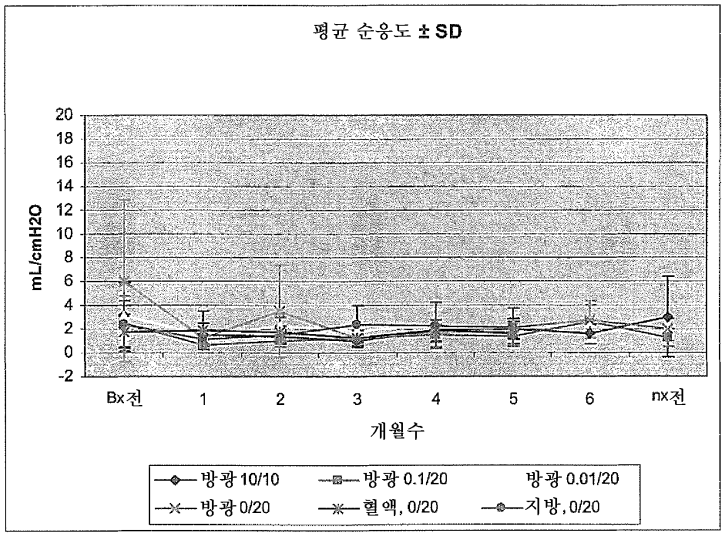

도면75



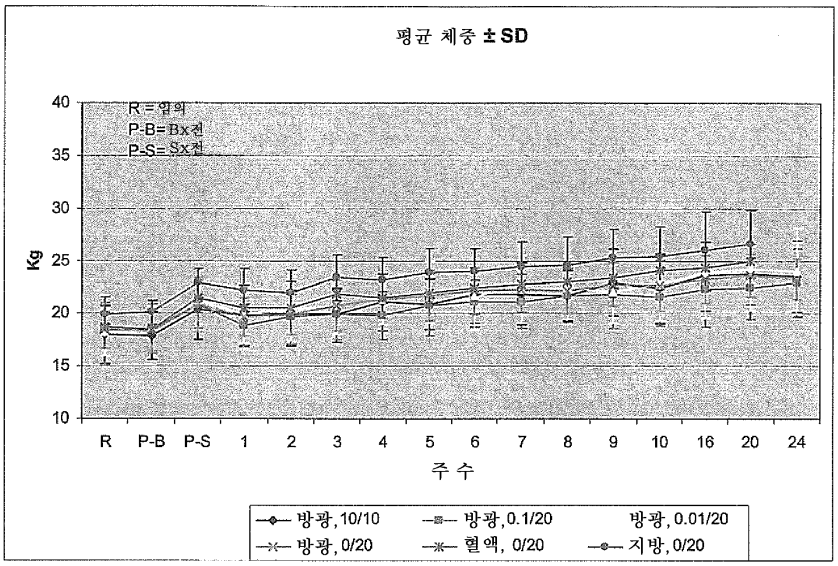
도면76a


수용량 ±SD
160
140
120
100
80
60
40
20
0
mL
Bx전
1
2
3
4
5
6
nx전
개월수
방광10/10
방광 0.1/20
방광 0.01/20
방광 0/20
혈액, 0/20
지방, 0/20

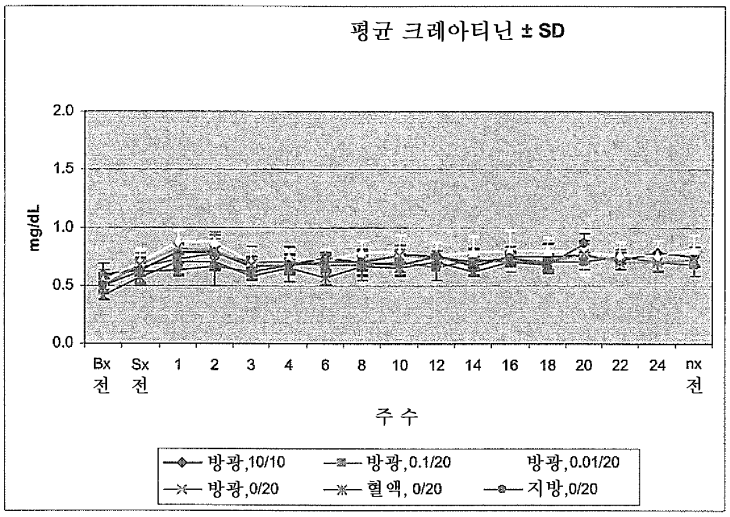
도면76b


평균 순응도 ± SD
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
mL/cmH2O
Bx전
1
2
3
4
5
6
nx전
개월수
방광 10/10
방광 0.1/20
방광 0.01/20
방광 0/20
혈액, 0/20
지방, 0/20

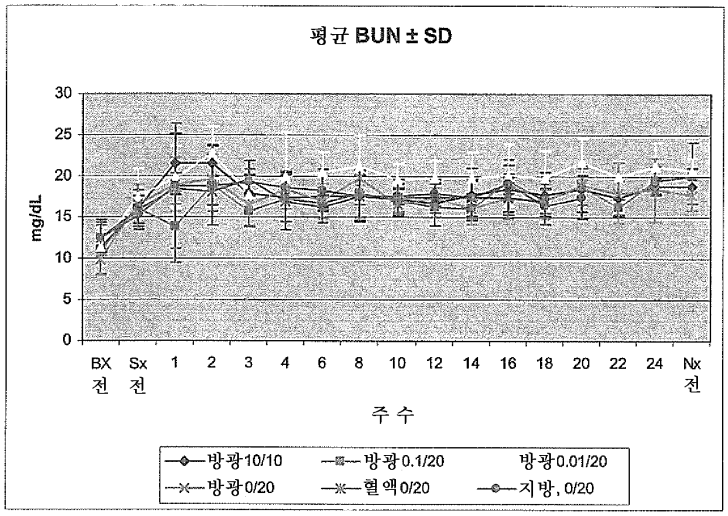
도면77


평균 체중 ± SD
R = 입의
P-B = Bx전
P-S = Sx전
Kg
40
35
30
25
20
15
10
R
P-B
P-S
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
16
20
24
주 수
방광, 10/10
방광, 0.1/20
방광, 0.01/20
방광, 0/20
혈액, 0/20
지방, 0/20

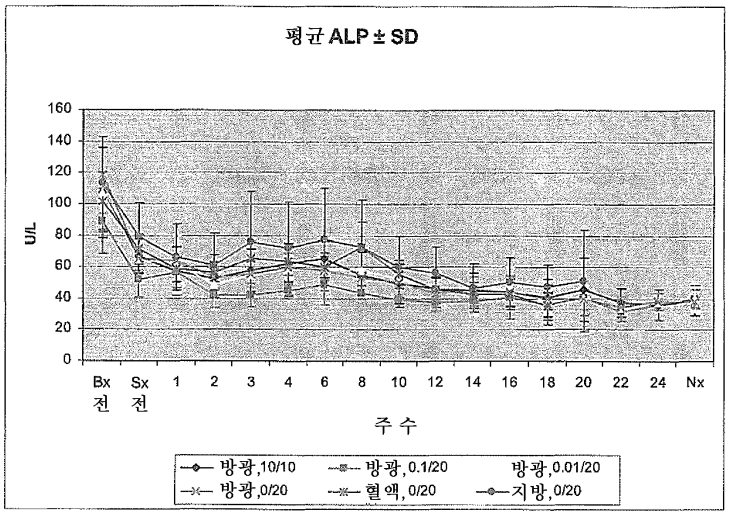
도면78


평균 크레아티닌 ± SD
mg/dL
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Bx 전
Sx 전
1
2
3
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
nx 전
주 수
방광, 10/10
방광, 0.1/20
방광, 0.01/20
방광, 0/20
혈액, 0/20
지방, 0/20

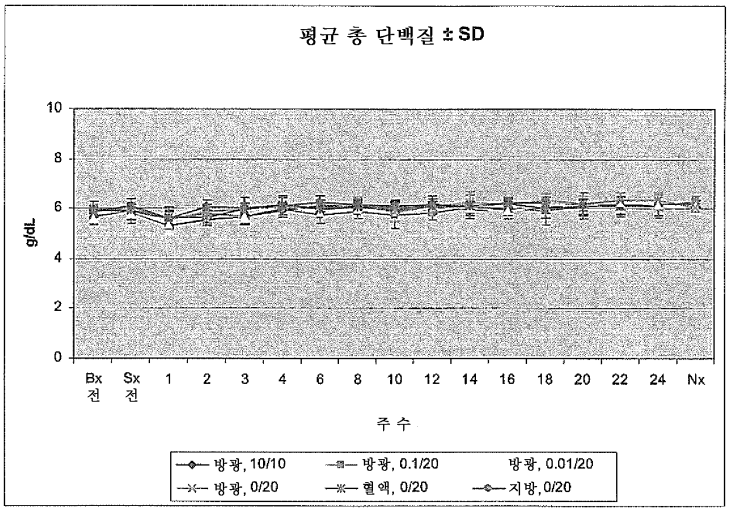
도면79


평균 BUN ± SD
mg/dL
30
25
20
15
10
5
0
BX 전
Sx 전
1
2
3
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Nx 전
주 수
방광10/10
방광0.1/20
방광0.01/20
방광0/20
혈액0/20
지방, 0/20

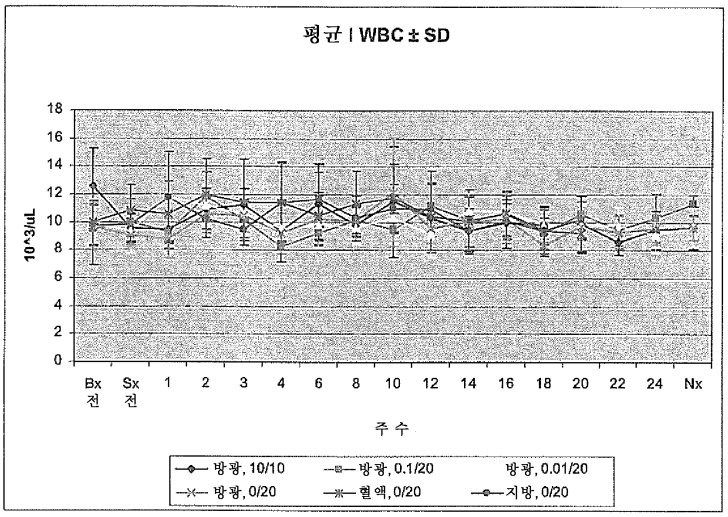
도면80


평균 ALP ± SD
U/L
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Bx 전
Sx 전
1
2
3
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Nx
주 수
방광,10/10
방광,0.1/20
방광,0.01/20
방광,0/20
혈액, 0/20
지방,0/20

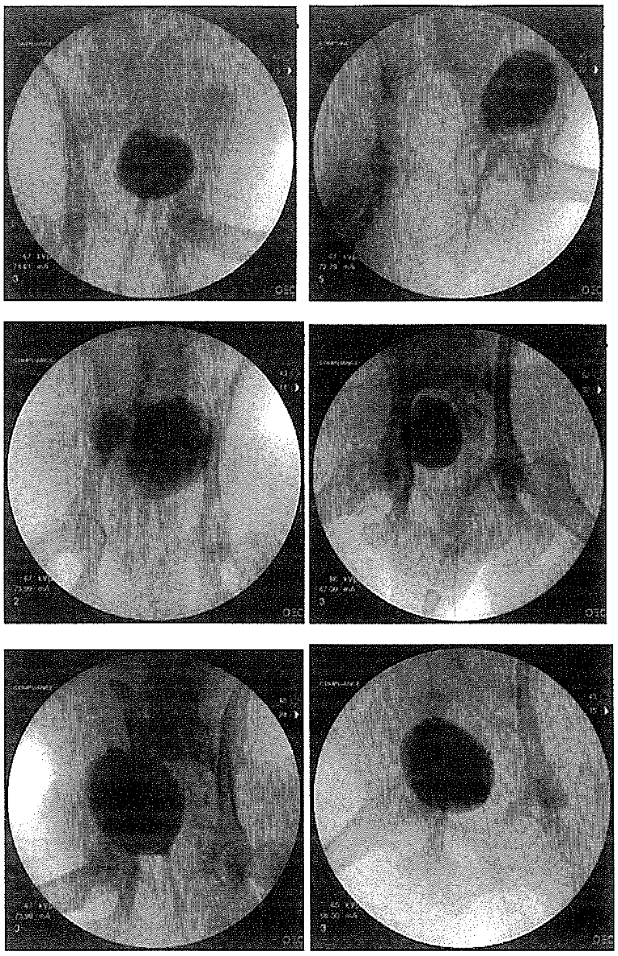
도면81


평균 총 단백질 ± SD
g/dL
10
8
6
4
2
0
Bx 전
Sx 전
1
2
3
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Nx
주 수
방광, 10/10
방광, 0.1/20
방광, 0.01/20
방광, 0/20
혈액, 0/20
지방, 0/20

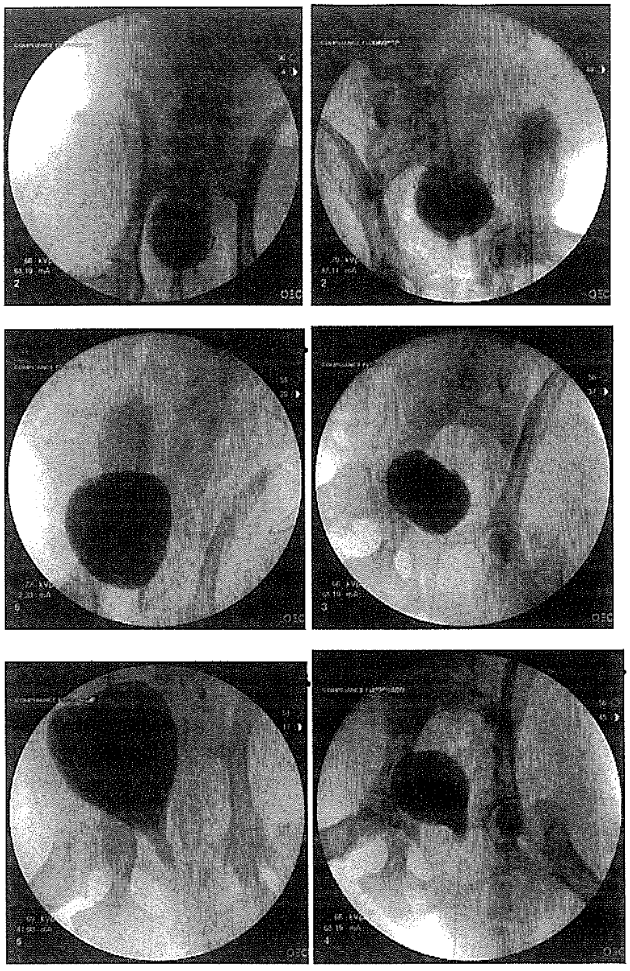
도면82


평균 I WBC ± SD
10^3/uL
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Bx 전
Sx 전
1
2
3
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Nx
주 수
방광, 10/10
방광, 0.1/20
방광, 0.01/20
방광, 0/20
혈액, 0/20
지방, 0/20

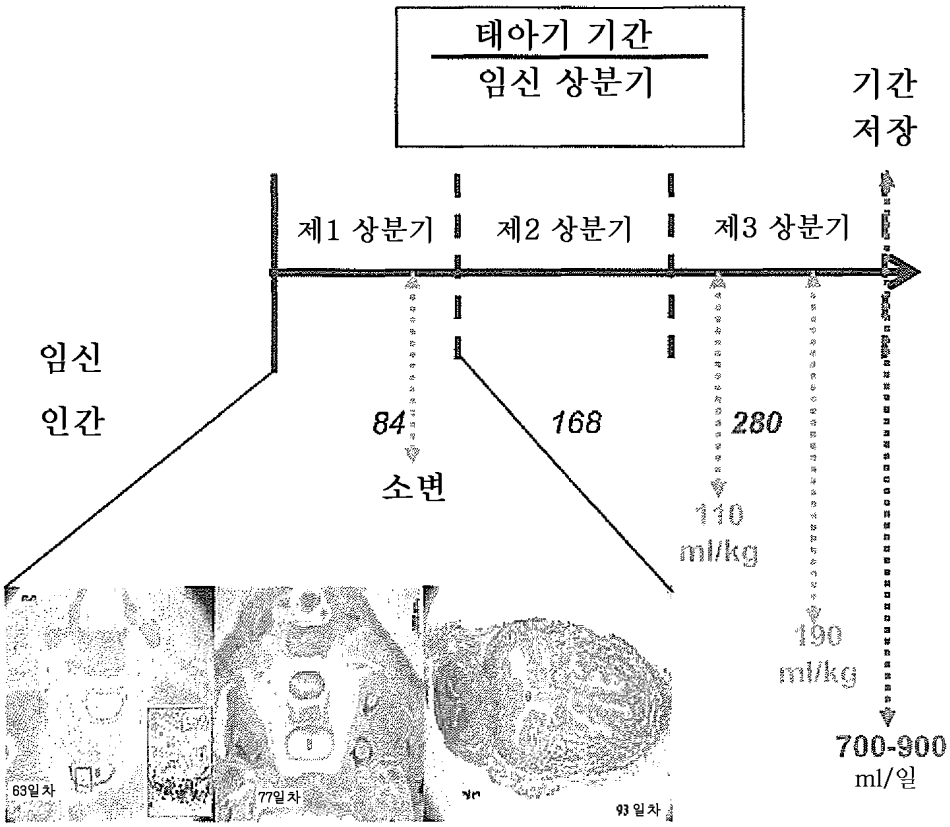
도면83



도면84

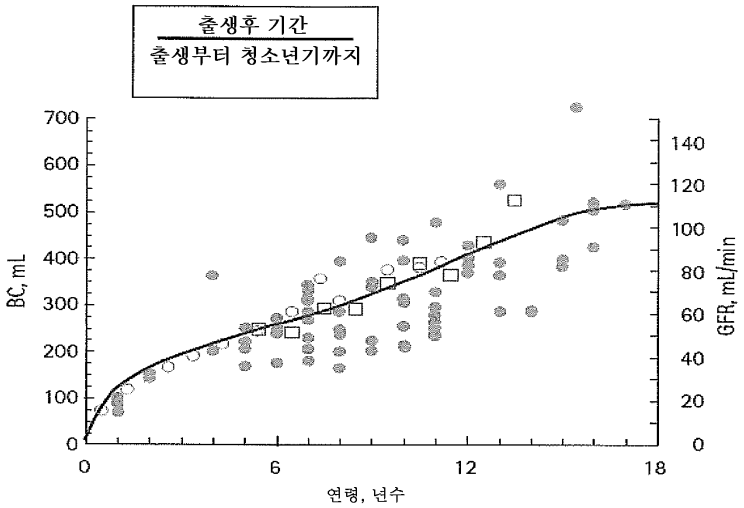


도면85




63일차 77일차 93일차

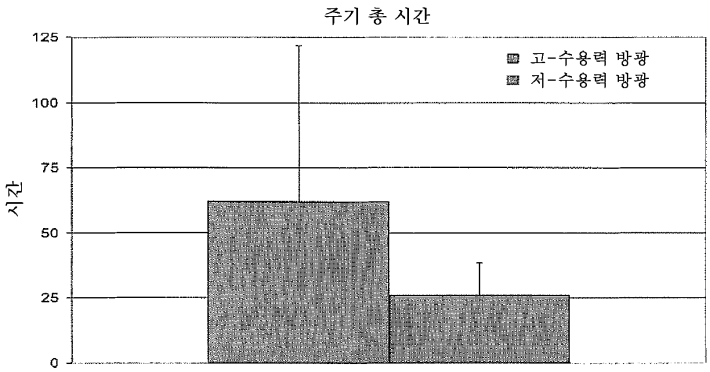
도면86



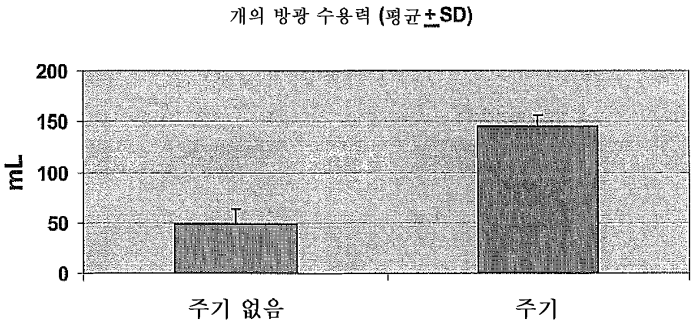
도면87a



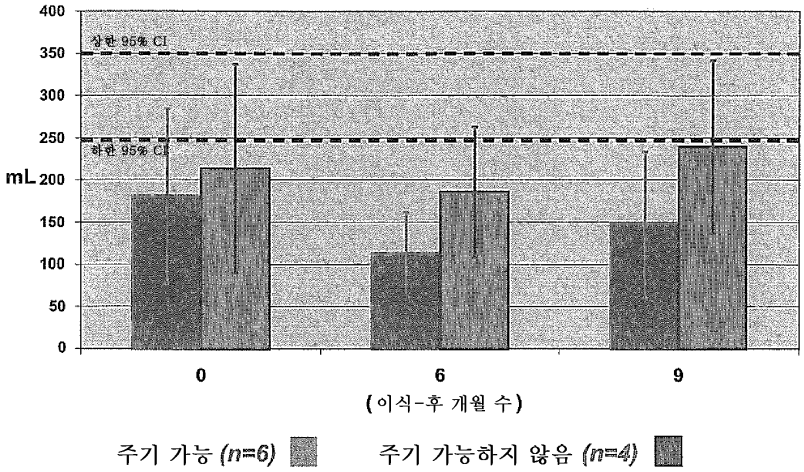

도면87b



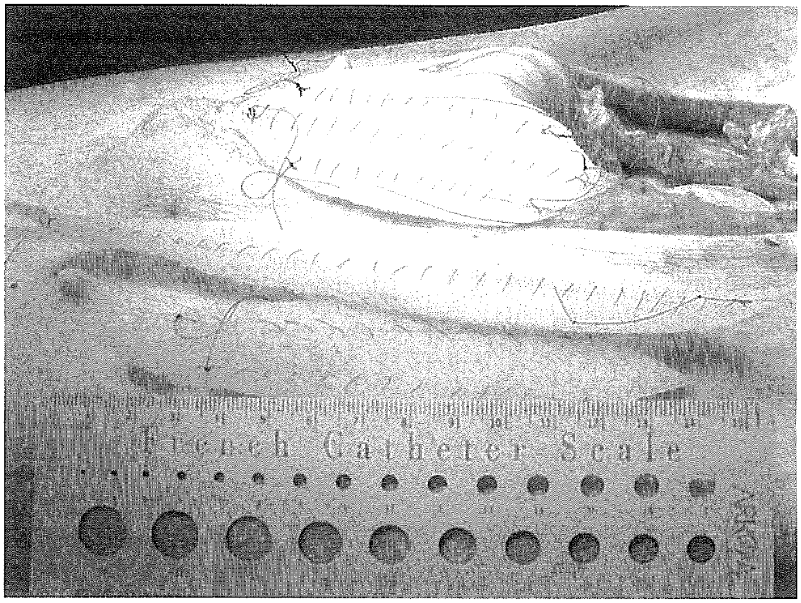

도면87c



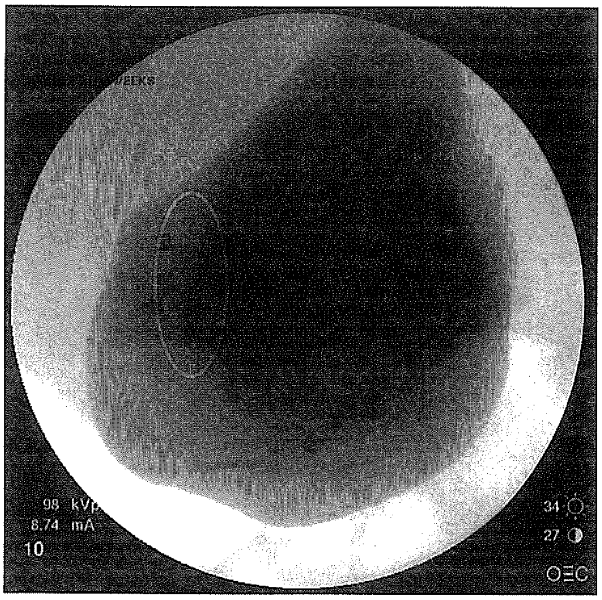
도면88


400
350
300
250
200
150
100
50
0
mL
상한 95% CI
하한 95% CI
0
6
9
(이식-후 개월 수)
주기 가능 (n=6)
주기 가능하지 않음 (n=4)

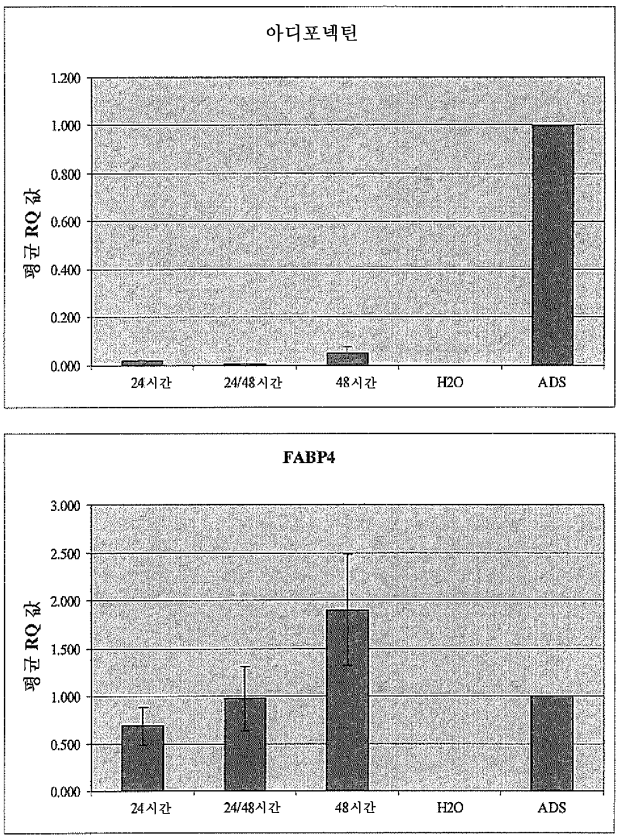
도면89


French Catheter Scale

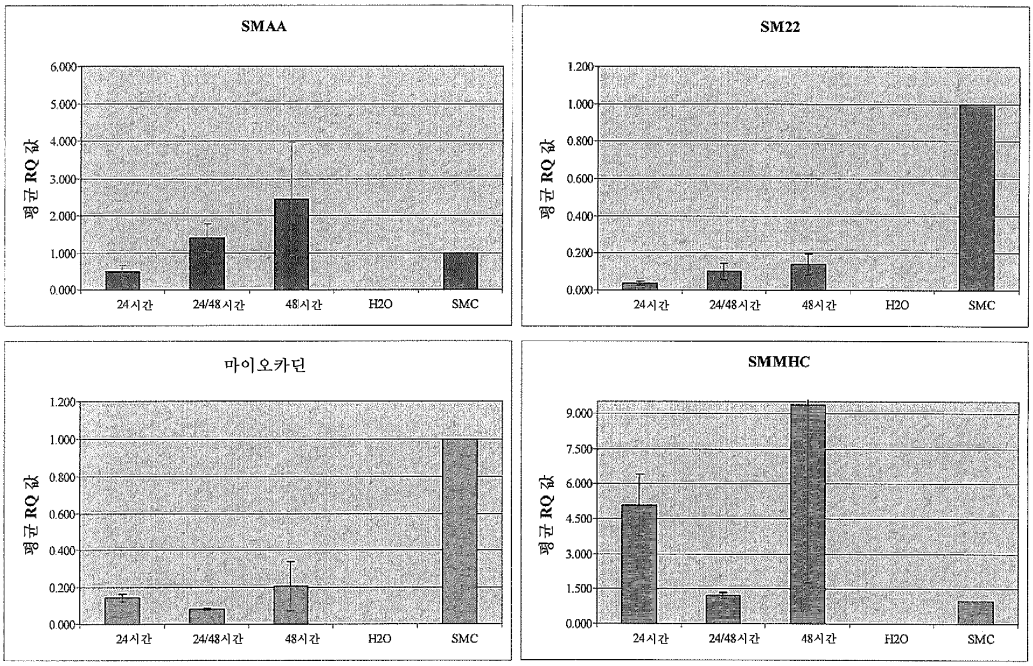
도면90


98 kV
8.74 mA
10
34
27

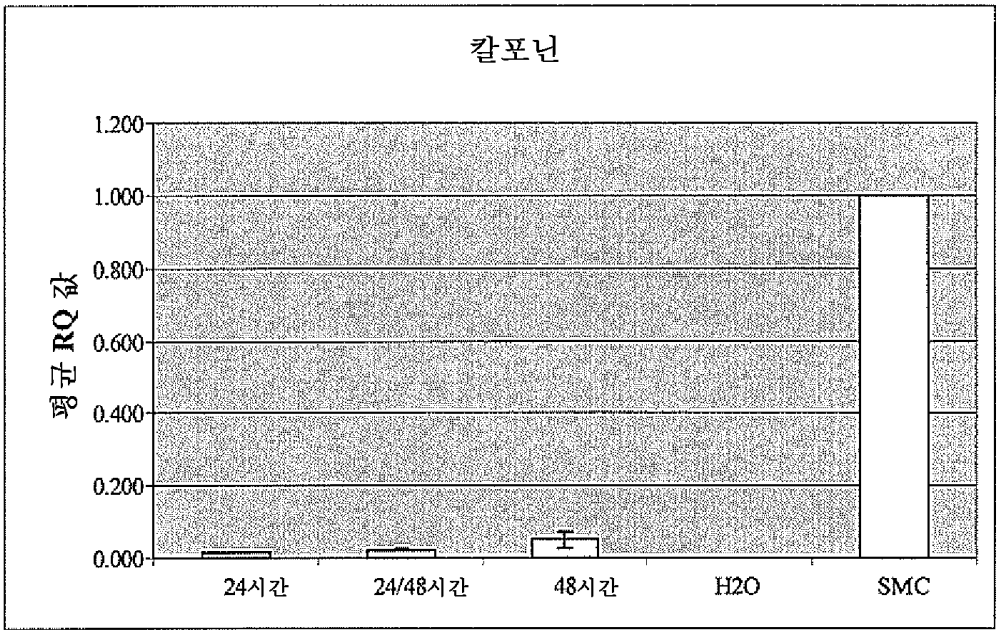
도면91a


아디포넥틴
평균 RQ 값
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
24시간
24/48시간
48시간
H2O
ADS
FABP4
평균 RQ 값
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
24시간
24/48시간
48시간
H2O
ADS

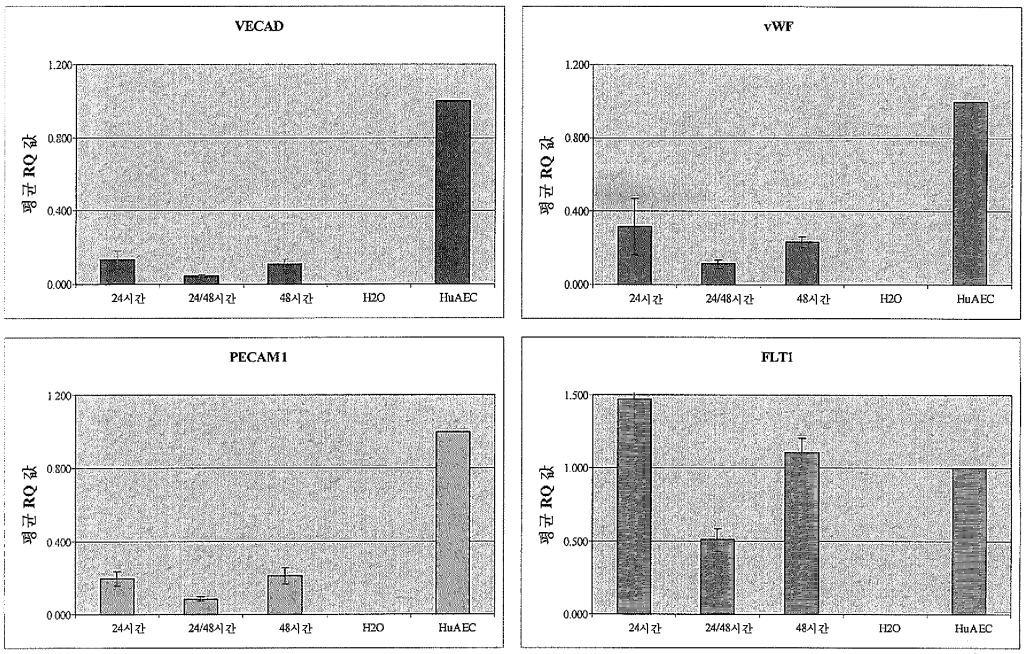
도면91b


SMAA
SM22
마이오카딘
SMMHC
평균 RQ 값
24시간
24/48시간
48시간
H2O
SMC

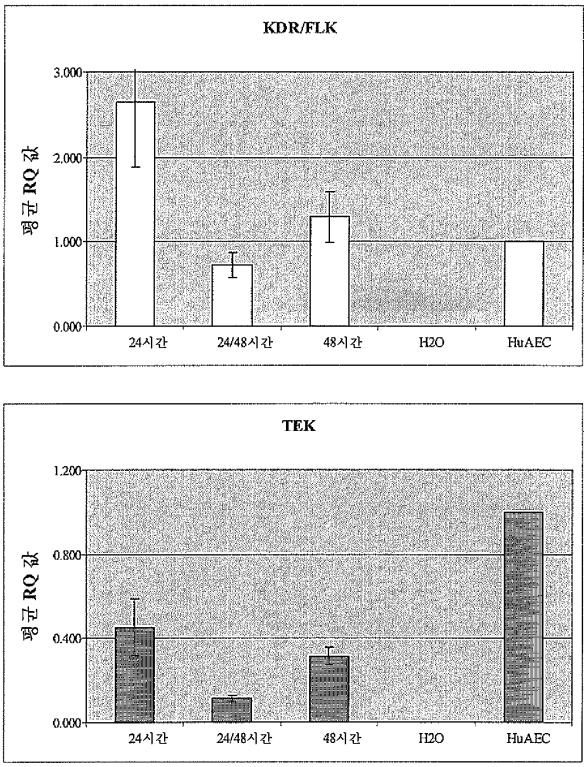
도면91c


칼포닌
평균 RQ 값
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
24시간
24/48시간
48시간
H2O
SMC

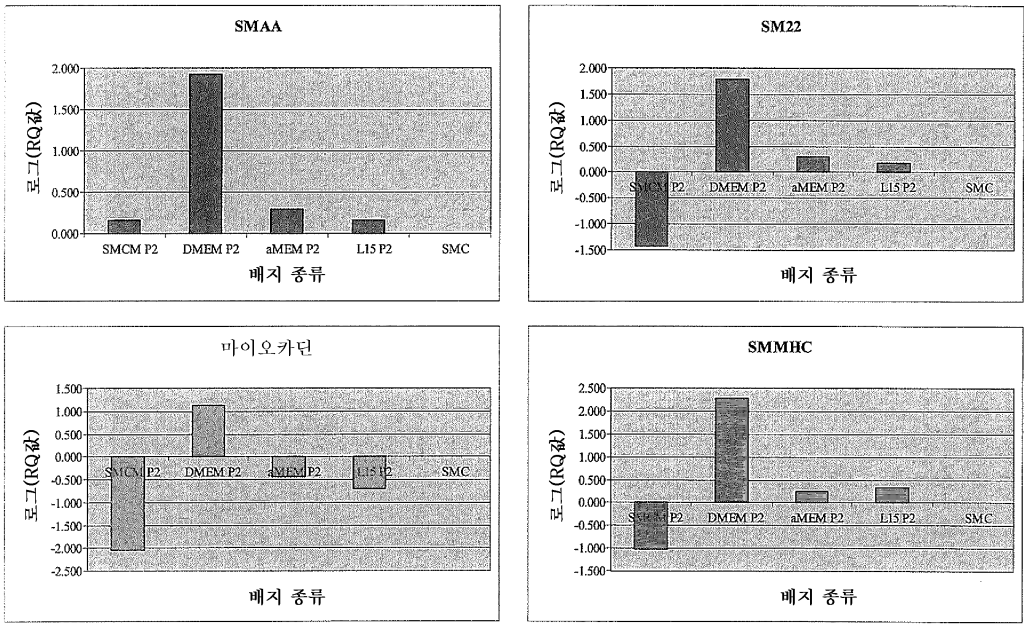
도면91d


VECAD
vWF
PECAM1
FLT1
평균 RQ 값
24시간
24/48시간
48시간
H2O
HuAEC

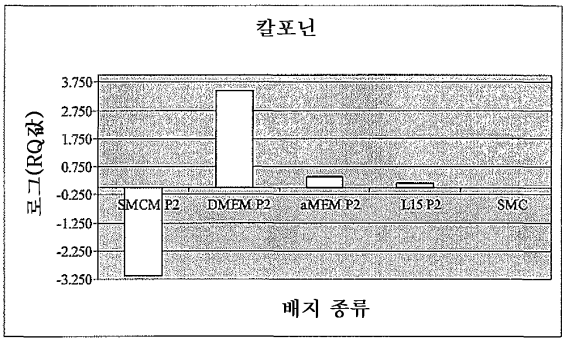
도면91e


KDR/FLK
TEK
평균 RQ 값
24시간
24/48시간
48시간
H2O
HuAEC

도면92a

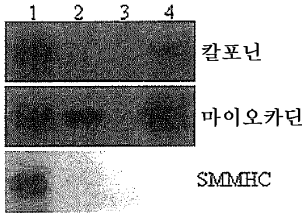



도면92b




도면93

MSC 및 AdSMC에서 SMC 마커 발현을 위한 RT-PCR

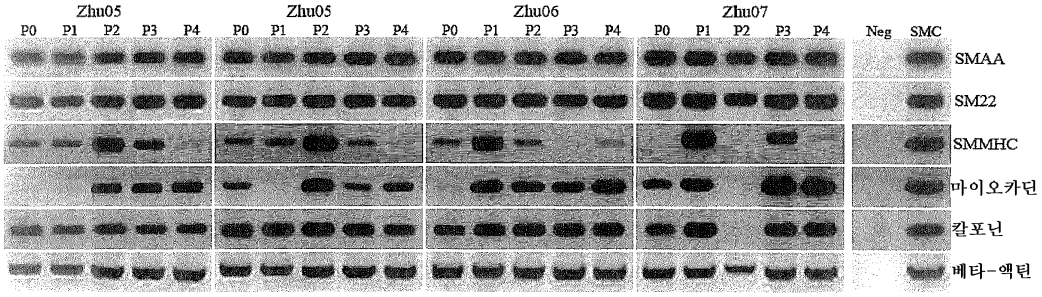



레인 내용물:

1. AdSMC
2. MSC
3. $H_2O$
4. SMC

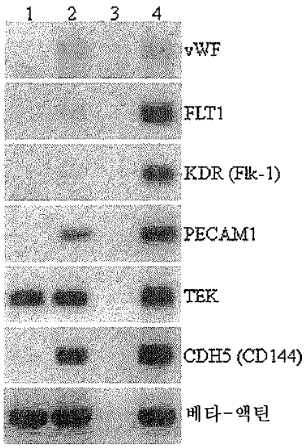
| 샘플 | 칼포닌 | 마이오카딘 | SMMHC |
|---|---|---|---|
| AdSMC | +++ | +++ | +++ |
| MSC | - | + | w+ |

도면94




도면95

MSC 및 AdSMC에서 내피 마커 발현을 위한 RT-PCR

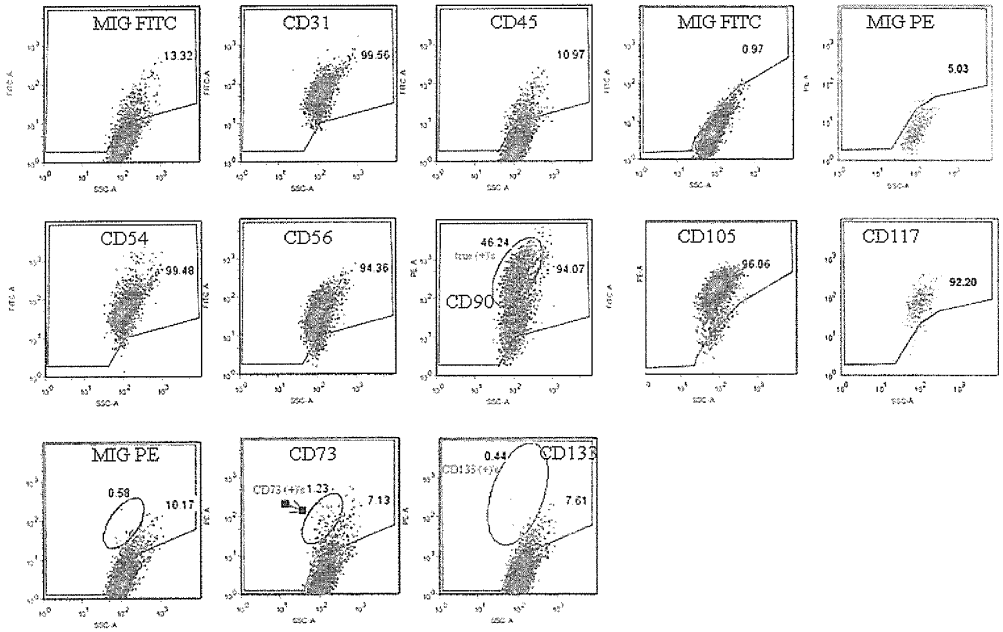



레인 내용물

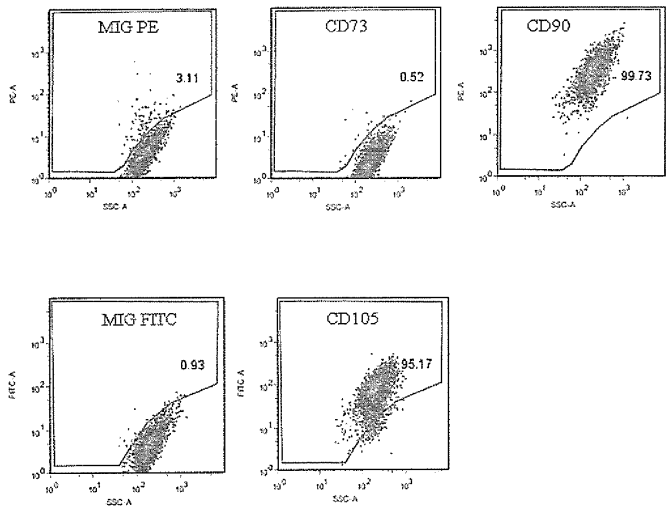
1. AdSMC
2. MSC
3. $H_2O$
4. HuAEC

| 샘플 | vWF | FLT1 | KDR (Flk-1) | PECAM1 | TEK | CDH5 (CD144) | 베타-액틴 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AdSMC | - | + | - | - | ++ | w+ | +++ |
| MSC | + | + | + | + | ++ | ++ | +++ |

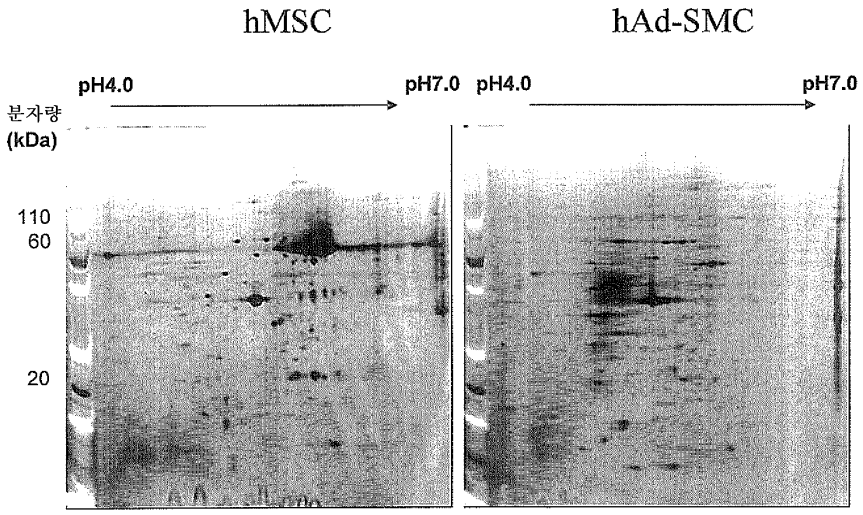
도면96


MIG FITC
13.32
CD31
99.56
CD45
10.97
MIG FITC
0.97
MIG PE
5.03
CD54
99.48
CD56
94.36
46.24
94.07
CD90
CD105
96.06
CD117
92.20
MIG PE
0.58
10.17
CD73
1.33
7.13
0.44
CD133
7.61

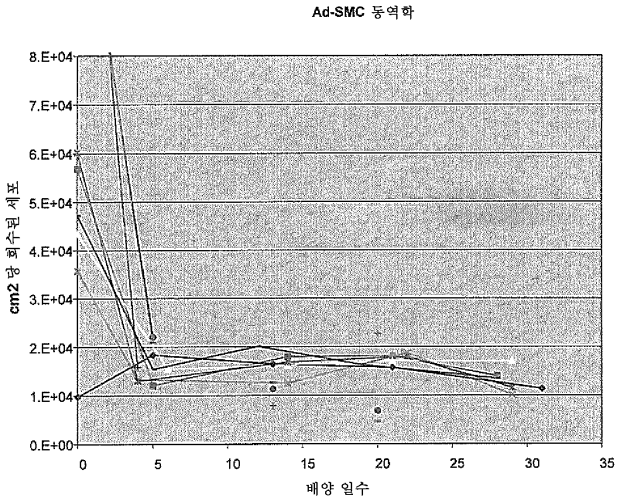
도면97


MIG PE
3.11
CD73
0.52
CD90
99.73
MIG FITC
0.93
CD105
95.17

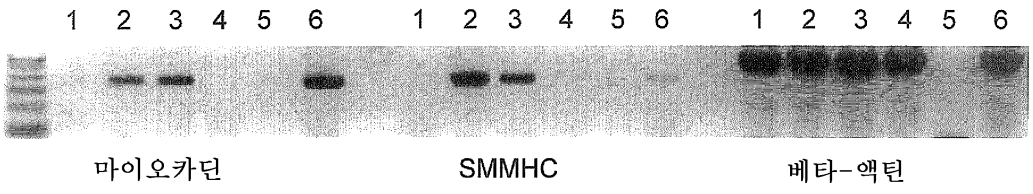
도면98




도면99

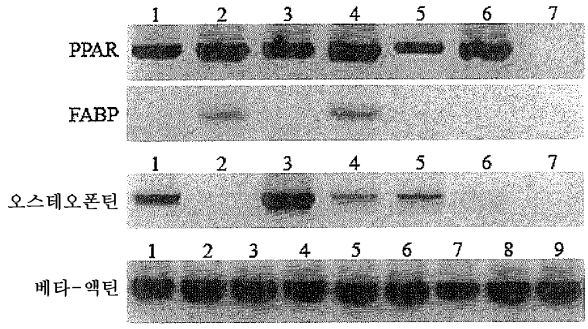



도면100

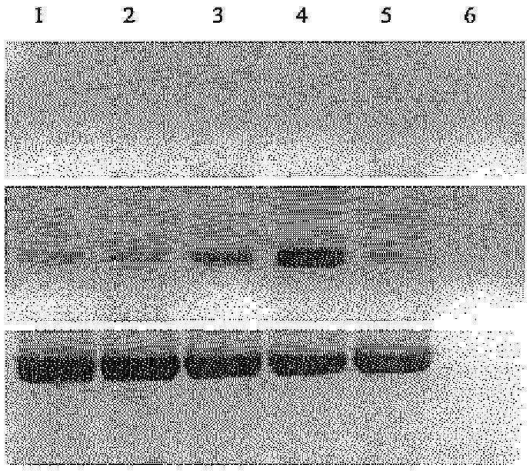



1. MSC 대조군
2. MSC + U46619
3. Ad-SMC 대조군
4. Ad-SMC + U46619
5. H2O
6. SMC

## 도면101




## 도면102




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> LUDLOW, JOHN W.

JAYO, MANUEL J.

BASU, JOYDEEP

BERTRAM, TIMOTHY A.

GENHEIMER, CHRISTOPHER W.

GUTHRIE, KELLY I.

ILAGAN, ROGER

JAIN, DEEPAK

KNIGHT, OLUWATOYIN A.

PAYNE, RICHARD

QUINLAN, SARAH F.

RAPOPORT, H. SCOTT

SANGHA, NAMRATA D.

<120> CELL-SCAFFOLD CONSTRUCTS

<130> TGN-1014 US

<140> 12/612,606

<141> 2009-11-04

<150> 61/201,550

<151> 2008-12-10

<150> 61/201,554

<151> 2008-12-10

<150> 61/201,555

<151> 2008-12-10

<150> 61/114,382

<151> 2008-11-13

<150> 61/114,388

<151> 2008-11-13

<150> 61/114,021

<151> 2008-11-12

<150> 61/113,542

<151> 2008-11-11

<150> 61/111,242

<151> 2008-11-04

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 1

ttctacaatg agctgcgtgt g 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 2

cgttcacact tcatgatgga gt 22

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 3

gatccaactg gtttatgaag aaagc 25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

tctaactgat gatctgccga ggtc 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 5

ccagcagatg tggatcagca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400

> 6

aagcatttgc ggtggacaat 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 7

gctcagaaag tttgccacct c 21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 8

tcctgctcca ggatgaacat 20

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

catgtcctct gctcacttca ac 22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 10

cccctcgatc cactctctca 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 11

aagagcacag ggtctcctca 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 12

actccgagtc atttgctgct 20