(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
A61F 2/30

(11) 공개번호 특1999-0087147
(43) 공개일자 1999년12월15일

(21) 출원번호 10-1998-0706539
(22) 출원일자 1998년08월21일
번역문제출일자 1998년08월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US1997/02909 (87) 국제공개번호 WO 1997/30662
(86) 국제출원출원일자 1997년02월20일 (87) 국제공개일자 1997년08월28일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체크 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 북한 대한민국 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 리투아니아
(30) 우선권주장 8/604,284 1996년02월21일 미국(US)
(71) 출원인 어드밴스드 티슈 사이언스, 인코퍼레이티드 게일 케이. 나우톤

미국, 캘리포니아 92037-1005, 라 졸라, 노스 토레이 파인스로드10933
(72) 발명자 나우톤, 게일, 케이.

미국 92014 캘리포니아주 델 마 루네타 드라이브 1280

윌로우비, 제인

미국 92075 캘리포니아주 솔라나 비취 로마 라가 드라이브 409
(74) 대리인 김영, 주성민

*심사청구 : 없음*

**(54) 연골의 생성 및(또는) 수복 방법**

## *요약*

본 발명은 골격을 제위치에 유지하고 연골세포의 선조 세포 공급원, 연골세포 및 생체내에서 골격에 부착시키기 위한 다른 간질 세포를 제공하기 위하여 사용될 수 있는 골막/연골막 조직과 함께 생체 적합성, 무생 3차원 골격 또는 외곽구조를 연골 결함 또는 상실 부위에서 환자에게 이식하는 단계를 포함하는, 생체내에서 연골의 제조 방법 및(또는) 수복 방법에 관한 것이다.

또한, 연골세포, 연골세포의 선조 세포 또는 다른 간질 세포를 포함할 수 있는 세포 제제는 골격 및(또는) 골막/연골막 조직의 이식 전, 동안 또는 후에 투여되고, 세포는 생체내의 이식 위치에 직접적으로 투여되어, 연골생성 및 이식 위치에서 신규한 연골을 생성시키기 위하여 인접한 생체내의 환경으로부터 골격으로 연골세포, 연골세포의 선조 세포 및 다른 간질 세포의 이동을 증가시키는 인자의 생성을 유도한다.

## *명세서*

본 발명은 생체 내에서 연골의 생성 및(또는) 수복 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 환자의 연골이 손상되거나, 또는 상실된 부위에서 골막/연골막 조직과 합해진 생체 적합성, 무생 3차원 골격 구조 또는 외곽구조를 환자에게 이식하고, 골격 및(또는) 골막/연골막 조직을 이식하기 전, 이식하는 동안이나, 또는 이식한 후, 연골세포 및(또는) 연골세포의 선조 세포 등의 다른 간질 (間質) 세포 제제를 이식 부위에 투여하는 것을 포함하는 연골의 생성 및(또는) 수복 방법에 관한 것이다. 골막/연골막 조직은 이식 부위에서 제위치에 골격을 유지시키고, 또한 생체 내에 골격을 부착시키기 위한 간질 세포의 공급원, 예를 들어 연골세포 및(또는) 연골세포의 선조 세포를 제공하는데 사용될 수 있다. 생체 내에서 이식 부위로 직접 시드된 간질 세포는 골격에 부착시키기 위한 연골 세포 및(또는) 다른 간질 세포의 쉽게 이용될 수 있는 공급원을 제공할 뿐만 아니라, 연골형성은 물론 제제의 간질 세포에 의해 생성되는 인자를 통해 생체 내 주변 환경으로부터 골격으로 간질 세포의 이동을 일으키는 신속하고 유효한 수단을 제공한다. 또한 시드된 간질 세포는 성장, 이식 및(또는) 질병 상태의 개선에 유익한 유전자 생성물을 발현하도록 유전공학적으로 변형될 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 생체내에서 신규한 연골의 유효한 생성을 일으킨다.

본 발명의 방법은 류마티즘성 질병 및(또는) 골관절염 등의 퇴행성 연결 조직 질병을 겪는 환자는 물론 외상으로 인한 연골 결함이 있는 환자에서 관절 연골의 생성 및 수복에 유용하다. 본 발명의 방법은 연

골 조직을 대체시키거나, 또는 확대시키는데, 신규하거나 또는 변형된 조직을 도입시키거나, 또는 생물학적 조직 또는 구조체를 함께 결합시키는데 사용될 수 있다.

## *배경기술*

예를 들어, 관절 또는 하이알린 연골, 신축성 연골 및 섬유연골 등의 다양한 종류의 연골이 있다. 관절 연골은 뼈의 관절 표면, 예를 들어 관절에서 발견되며 가동성 관절의 특징적인 평활 활주 운동을 일으킨다. 관절 연골은 뼈 밑에 단단히 부착되어 있고, 관절 및 관절 내 위치에 따라 다르기는 하나 사람의 경우 두께가 5 mm 이하이다. 또한 관절성 연골은 무신경, 무혈관 및 무임파성이다. 성인의 경우 연골은 활액막을 통해서, 연골의 밀집된 매트릭스를 통한 이중 확산 시스템에 의해 그 영양물을 이끌어내어 연골의 연결 조직에서 발견되는 세포인 연골세포에 이르게 한다.

사실상, 관절 연골은 주로 타입 (type) II 콜라겐, 프로테오글리칸 및 물로이루어진 농후한 세포외 매트릭스로 둘러싸인 고도로 분화된 연골세포로 이루어진다. 관절 연골의 생화학적 조성물은 물 65-80% 이하(연골에 따라 다름)를 포함하나, 연골의 콜라겐 성분은 가장 일반적인 유기 성분이다. 콜라겐 (주로 타입 II)은 건조 중량의 대부분을 차지하는 표면 영역을 제외하고는 습윤 중량의 약 15-25% 또는 건조 중량의 약 반을 차지한다. 일반적으로 그 농도는 관절 표면으로부터 깊이가 깊어짐에 따라 서서히 감소된다. 프로테오글리칸 함량은 습윤 중량의 10%이하, 또는 건조 중량의 약 1/4이다. 프로테오글리칸은 주로 콘드로이틴 술페이트 및 케라틴 술페이트 형태의 직쇄 황산염 다당류가 결합된 단백질 코어로 이루어진다. 타입 II 콜라겐외에, 관절 콜라겐은 독특한 구조를 갖는 다수의 다른 콜라겐 타입 (IV, V, IX 및 X)을 포함한다. 이들 개별 거대분자 사이에 다양한 상호작용이 있는데, 이에는 프로테오글리칸 및 콜라겐 사이의 비공유 결합과, 상이한 콜라겐 종류간의 공유 결합 모두가 포함된다. 수류에 대한 세포외 매트릭스의 저항성은 연골에 고도의 관절 하중을 분배시키는 능력을 부여한다. 이것은 충격을 흡수하고, 연골하 뼈에 대한 스트레스를 최소화시킨다 [Mow et al., 1984, J. Biomech. 17:377-394]. 그러나, 성인의 연골 및 뼈는 제한된 회복 능력을 가지므로 류마티즘성 질병 및(또는) 골관절염 또는 외사 등의 질병에 의해 생성되는 연골에 대한 손상은 심한 신체적 기형 및 쇠약을 일으킬 수 있다. 또한, 사람 관절 연골은 노화에 따라 장력 특성이 변한다. 무릎 관절 연골의 표면 영역은 인생의 30년 이전까지는 장력이 증가하나, 그 후 노화에 따라 현저히 감소되어 타입 II 콜라겐에 대한 검측 가능한 손상이 관절 표면에서 발생한다. 노화에 따라 콜라겐 함량은 감소되지 않으나, 심부 영역 콜라겐은 장력의 점진적 감소를 또한 나타낸다. 이들 관찰 결과가 나타내는 바는 노화에 따라 충분히 진행된다면 외상성 손상에 대해 연골을 예비배치시킬 수 있는 연골 구성의 기계적, 구조적 변화가 있다. 골관절염성 연골의 경우, 타입 II 콜라겐에 대한 과도한 손상으로 인해 콜라겐 원섬유의 수축을 일으키다. 류마티즘성 관절염의 경우, 다형핵 백혈구로부터 방출된 유리 라디칼 및 프로틴아제는 관절 표면에서 관찰되는 상당한 손상을 일으킨다 [Tiku et al., 1990, J. Immunol. 145:690-696]. 연골세포에 의한 연골 매트릭스 분해 및 프로틴아제의 유도는 아마도 주로 인터루킨-1 (IL-1) 또는 종양 괴사 인자-α (TNF-α)에 의해 유도되는 것 같다 [Tyler, 1985, Biochem. j. 225:493-507].

연골의 손상 또는 상실을 위한 현재의 치료요법은 보철 물질, 예를 들어 미용적 수복을 위한 실리콘, 또는 관절 재정렬을 위한 금속 합금으로 대체하는 것이다. 보철 장치의 이식은 일반적으로 원래의 연골에 의해 주어지는 완전한 기능이 회복되지는 않은 채 하부 조직 및 뼈가 상실되는 것과 관련된다. 영구한 이종 신체의 존재와 관련된 심한 장기간 합병증은 감염, 짓무름 및 불안정성을 포함할 수 있다.

멸균 뼈 또는 뼈 분말, 또는 결국 이식되는 뼈 셀로 시드된 외과용 강철은 셀 지지물의 비분해 특성 때문에 대부분은 성공적이지 못했다. 한 방법에 따라, 연골형성 반응을 자극시킬 수 있는 수용성 뼈 단백질에 섬유아세포를 생체 외에서 최소 3일 동안 노출시킨다. 이어서 활성화된 섬유아세포를 생체분해가능한 매트릭스와 합하거나, 또는 관절내 주입시키거나, 또는 동종이식 또는 보철 장치를 부착시킴으로써 생체내에서 전달시킨다. 이 방법의 단점은 연골형성이 단기간 배양으로는 발달되지 않으며, 이식 부위에서 노출된 섬유아세포에 의한 연골 합성에 대해 지나치게 과도한 의존성을 갖는다는 것이다 [카플란 (Caplan, A.,)의 1986년 9월 2일 발행된 미국 특허 제4,609,551호]

베컨티 등 (J.P. Vacanti et al.,)의 미국 특허 제5,041,138호 (1991년 8월 20일 발행)에는 생체 내 후속 이식을 위해 생체 외 생체분해가능한 매트릭스 상에 연골세포를 시드시킴으로써 연골성 구조를 성장시키는 것이 기재되어 있다. 카플란 등의 미국 특허 제5,197,985호 (1993년 3월 30일 발행) 및 동 제5,226914호 (1993년 7월 13일 발행)는 생체 외에서 성장 인자의 존재하에서 골수로 유도된 간엽 (間葉) 간(幹)세포를 성장시키고, 이 세포를 담체, 예를 들어 다공성 자기 부형제에 적용시키고, 둥근 세포 형태를 촉진시키고, 세포를 포함하는 담체를 손상된 관절 연골에 이식시키는 것에 관한 것이다. 마지막으로, 슈미드트 등 (Schmidt et al.,)의 미국 특허 제4,520,821호 (1985년 6월 4일 발행)는 생체흡수가능한 메쉬 또는 거즈를 이용하여 생물학적 조직 교정 구조를 성장시키는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시태양에 따라, 신체의 결함 지역으로부터 생물학적 조직을 제거하고 생체흡수가능한 메쉬 상에서 생체 외 성장시키고, 결함 지역에 메쉬가 완전히 흡수될 수 있게 하기에 충분한 장시간 동안 조직/메쉬 구조를 배치시킨다. 상기 인용된 모든 접근법에서, 연골 손상 부위에 이식시키기 위해 생체 외에서 담체에 세포를 적용시킨다.

그란데 등 (Grande et al.,)의 미국 특허 제4,846,835호 (1989년 7월 11일 발행)에는 또한 생체 외에서 자가이식 연골세포를 배양시키고, 생체 외에서 콜라겐 매트릭스 상에 연골세포를 시드시킴으로써 관절 연골 치유를 촉진시키기 위한 동종이식 기술이 기재되어 있다. 이 문헌에는 또한 연골 손상 부위에 연골세포/콜라겐 매트릭스를 이식시키고, 연골에 골막 플랩을 봉합시킴으로써 이식조직을 기계적으로 고정시키는 것이 기재되어 있다. 이 문헌에는 골막은 연골형성 가능성이 거의 없으며 그 안에 사용되는 골막 플랩은 동일한 고정 목적을 달성하도록 재흡수가능한 생체 적합성 중합체로 대체될 수 있다는 것이 교시되어 있다. 문헌 [von Schroeder et al., 1991, J. Biomed. Mat. Res. 25: 329-339]는 동물에서 전체 두께의 골연골 결함을 수복하기 위해 폴리락트산 매트릭스와 합해진 골막 이식조직에 관한 것이지만, 문헌 [Messner, 1994, Biomaterials 15 (No.3): 223-230]에는 전체 두께의 골연골 결함을 수복하기 위한 테플론 (Teflon) 및 데크론 (Dacron) 펠트와 합해진 골막 이식조직이 동물에서 정상적인 연골 수복을 달성시키기에는 불만족스럽다는 것이 실험이 기재되어 있다. 문헌 [O'Driscoll et al., 1986, J. Bone and

Joint surg. 68-A (No.7): 1017-1035; O'Driscoll et al., 1985, 31st Annual ORS, p. 292, Las Vegas, Nevada, Jan. 21-24, 1985; Rubak, 1992, Acta. Orthop. Scand. 53: 175-180; 및 Messner et al., 1993, Biomaterials 14 (No.7): 513-521]은 동물에서 이러한 결함의 수복을 위해 전체 두께의 관절 결함에 직접 놓여지는 자가 골막 이식조직을 사용하는 것에 관한 것이다.

또한, 문헌 [Thoma et al., 1992, Plast. Reconstr. Surg. 91 (No.2): 307-315 및 Bruns et al., 1992, Vichows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 421 (No.1): 1-8]은 동물에서 전체 두께의 관절 결함을 수복시키기 위해 자가 골막 이식조직을 사용하는 것에 관한 것이다. 토마 (Thoma)는 현저한 퇴행성 변화는 골막 이식조직에서의 골관절염과 유사하다는 것을 언급하였고, 이러한 큰 결함의 자발적 수복은 시도된 골막 이식조직 보다 더 정상인 신규한 관절 연골을 야기시킬 수 있다고 결론지었다. 브룬스 (Bruns)는 내중량 영역에는 존재하지 않으나, 비내중량 영역에 존재하는 하이알린 유사 연골을 언급하였다. 마지막으로, 문헌 [Bean et al., 1994, ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 56: 224-229]에는 토끼에서 전방 후두벽의 수복을 위해 광물질이 제거된 우골 매트릭스 및 자가 연골막을 사용하는 것이 보고되어 있다.

<발명의 요약>

본 발명은 골격을 제위치에 유지하고 연골세포의 선조 세포 공급원, 연골세포 및 생체내에서 골격에 부착시키기 위한 다른 간질 세포를 제공하기 위하여 사용될 수 있는 골막/연골막 조직과 함께 생체 적합성, 무생 3차원 골격 또는 외곽구조를 연골 결함 또는 상실 부위에서 환자에게 이식하는 단계를 포함하는, 생체내에서 연골의 제조 방법 및(또는) 수복 방법에 관한 것이다.

또한, 연골세포, 연골세포의 선조 세포 또는 다른 간질 세포를 포함할 수 있는 세포 제제는 골격 및(또는) 골막/연골막 조직의 이식 전, 동안 또는 후에 투여되고; 세포는 생체내의 이식 위치에 직접적으로 투여되어, 연골생성 및 이식 위치에서 신규한 연골을 생성시키기 위해 인접한 생체내의 환경으로부터 골격으로 연골세포, 선조 세포 및 다른 간질 세포의 이동을 일으키는 인자의 생성을 촉진시킨다.

더욱 구체적으로는, 3차원 골격은 간질성 간격을 함유하고, 여기서 이식된 골막/연골막 조직을 포함하는 인접한 생체내의 환경으로부터의 선조 세포, 연골세포 및 다른 간질 세포는 골격 구조상 및 내에서의 부착 및 성장을 위하여 이동한다. 골격 및 골막/연골막 조직과 함께 시드된 간질 세포 제제는 연골생성 및, 예를 들어, 부착 및(또는) 분화를 위한 골막/연골막 조직으로부터 골격으로의 간질 세포의 이동을 촉진시키는 생물학적 인자를 생성시키는 즉시 사용가능한 연골세포 및 다른 간질 세포의 공급원을 제공한다. 또한, 간질 세포의 제제는 골격으로 이동하여 그곳에 부착될 수 있는 간질 세포의 직접적인 공급원, 예를 들어, 연골세포 및(또는) 선조 세포를 제공한다. 골격중의 간질 세포는 골막/연골막 조직, 외생성 간질 세포 제제는 또는 이식 부위에 인접한 생체내의 환경으로부터 유도되었는지는 상관없이 골격중의 간질 세포는 골격상에서 성장하여 세포 매트릭스를 형성하고, 생체내의 연골 결함 위치에서 연골 형성에 필요한 지지물, 성장 인자 및 조절 인자를 제공한다. 따라서, 본 발명의 방법은 이식 부위에서 생체내의 신규한 연골의 생성을 가져온다.

본 발명 방법의 바람직한 태양에 있어서, 골막/연골막 조직은 연골 결함 또는 손실 위치에서 이식된 골격상에 위치하고, 예를 들어, 봉합에 의하여 그 위치에 부착됨으로써, 골격을 제위치에 유지시킨다. 추가로 바람직한 태양에 따라, 골격은 생체 분해성 물질로 구성되어, 성공적인 접합시에, 골격 구조는 생체내로 완전하게 흡수되어, 그내로 유입된 아무런 외계의 비생존 물질도 갖지 않는 신규한 연골을 생성시킨다.

또다른 바람직한 태양에 따라, 연골세포 및(또는) 다른 간질 세포의 제제는 골격 및 골막/연골막 조직이 이식된 후, 생체내에서 이식 부위에 투여된다. 본 발명의 추가의 태양에 있어서, 세포 성장 인자(예를 들어, TGF-β)와 같은 생체활성제, 연골생성을 촉진시키는 인자(예를 들어, 연골 형성을 촉진시키는 골형성 단백질(BMPs)), 간질 세포의 이동 및(또는) 매트릭스 침착을 촉진시키는 인자, 소염제 및 면역억제제는 이식 부위에 포함된다. 예를 들어, 이들 인자들은 골격 물질로 혼합되어 이식 부위에서 방출을 제공할 수 있고; 또한 골격은 하나 이상의 이들 생체활성제를 포함하거나, 이들로 코팅될 수 있다. 다른 방법으로는, 인자(들)은 간질 세포의 시드 전, 동안 또는 후에 골격으로 또는 그 인접한 지역으로 투여될 수 있고, 예를 들어, 생체활성제(들)는 개별적인 제제로서 또는 간질 세포 제제의 일부분으로서 그 위치에 투여될 수 있다. 또한, 결함 위치에 시드된 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 이들 생체활성제, 예를 들어, TGF-β1과 같은 특정 형태의 TGF-β 또는 BMP-13과 같은 특정 형태의 BMPs를 위한 유전자들을 발현시킬 수 있다. 이들 생체활성제로 결함 위치의 노출은 신규한 연골의 성공적이고(이거나) 개선된 생성을 촉진시키고(시키거나), 예를 들어, 이식과 관련된 거부 및 오염의 위험을 감소시켜 이식의 결과를 개선시킨다.

예를 들어, 본 발명의 태양에 따라, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 소염 유전자 생성물을 발현시킴으로써 염증 반응으로 인한 연골 손상을 가져오는 류마트즘성 관절염과 같은 퇴행성 질병의 효과를 완화시킬 수 있고; 예를 들어, 간질 세포가 생성되어 과립성 백혈구 거대세포 군체 촉진 인자(GM-CSF), 종양 회저 인자(TNF), 인터루킨(IL-2), 또는 다른 염증 시토킨 및 매개체를 위한 중화 항체의 유전자형에 상응하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다.

또다른 태양에 따라, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 인접한 생체내의 환경으로부터 이식 부위의 골격으로 간질 세포의 이동을 향상시키는 조직 인자를 발현시킬 수 있다.

바람직하게는, 세포는 유전공학적으로 변형되어 후-조작 회복 기간 동안 일시적으로 및(또는) 유도가능 조절하에서 또는 간질 세포에 부착된 알 수 없는 융합 단백질, 예를 들어, 내부세포 및(또는) 유전자 생성물에 외부세포 영역으로서 융합된 수용체 또는 수용체-유사 분자의 투과막 영역으로 구성된 알 수 없는 분자로서 이러한 유전자 생성물을 발현시킨다.

또다른 선택적인 태양에 있어서, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 노화, 류마티즘성 질병 또는 염증으로 인한 관절 연골중에서 이식의 거부 또는 퇴행성 변화를 촉진시키는 인자의 발현을 '넉아웃(knock-out)' 시킬 수 있다. 예를 들어, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2 및 시토킨과 같은 프로-염증 매개체의 발현은

외생적-투여된 간질 세포중 또는 이식된 골막 또는 연골막 조직상에서 녹아웃되어 염증의 위험을 감소시킬 수 있다. 마찬가지로, 이식 거부의 위험을 감소시키기 위하여 세포 또는 조직상에서의 MHC 군 II 분자의 발현을 녹아웃 시킬 수 있다.

본 발명의 또다른 태양에 있어서, 본 발명의 방법은 이식의 결과를 보조하거나 개선시키기 위하여 생체내에 유전자 및 유전자 생성물을 도입하고(하거나) 유전자 치료에 사용하기 위한 기구를 제공할 수 있다. 예를 들어, 류머티즘성 질병 또는 염증 반응 및 골 재흡수와 같은 연골중의 퇴행성 변화의 징후를 방지하거나 완화시키는 유전자는 질병 조건 및(또는) 노화로 인하여 과소발현되거나 과도발현될 수 있다. 따라서, 환자에 있어서 유전자 활성도는 유전공학적으로 변형되어 간질 세포 중에서 활성 유전자 생성물의 수준을 조정하는 유전자 치환 치료법에 의하여 각각 증가되거나 감소될 수 있다.

또다른 바람직한 태양에 있어서, 이식 조직이 위치하게 될 연골 결함 위치는 바람직하게는, 이식전에 처리되어, 결함 위치에 이미 존재하는 연골을 퇴화시키고, 세포를 유리시켜 이식 조직을 골격으로 이동시키고 신규한 연골의 규칙적인 침착을 촉진시킨다. 이러한 처리 방법은 효소 처리, 마멸 또는 미세천공을 포함한다. 추가의 태양에 따라서, 본 발명 간질 세포의 제제는 퇴행된 연골의 결합 위치, 예를 들어, 포위된 세포 또는 결함의 벽으로 주입되어 퇴행성 연골로부터 이식 조직으로 간질 세포의 이동을 유발시키는 생물학적 인자의 공급원을 제공한다.

## *발명의 상세한 설명*

본 발명은 골막/연골막 조직과 함께 생체 적합성, 비생존 물질로 제조된 3차원 골격 또는 외곽구조의 생체내에서의 이식 및 생체내의 이식 부위에서 시드된 연골세포 또는 연골세포의 선조 세포와 같은 간질 세포의 투여를 포함하는, 생체내에서 연골의 제조 방법 및(또는) 회복 방법을 포함한다.

본 명세서에서 사용된 바와 같은 '연골세포 선조 세포'라는 용어는 (1) 다효능, 또는 계통-중립의 선조 세포, 전형적으로는 '간세포' 또는 '간엽 간세포'라고 당업계에서 언급되고 있고, 이는 잠재적으로 제한되지 않은 수의 유사 분열 구획을 가능케하여 그의 라인을 회복시키거나 연골세포로 변이될 선조 세포를 생성하고, (2) 결과적으로 연골세포로 변이될 간세포의 유사 분열 구획으로부터 생성된 계통-편향 선조 세포에 관한 것이다. 유도된 간세포와는 다르게, 계통-편향 선조 세포는 일반적으로 제한되지 않은 수의 유사 분열 구획이 될 수 없을 것이라고 여겨지고 결과적으로 연골세포로 변이될 것이다.

본 명세서에서 사용된 바와 같은 '연골' 또는 '연골 조직'이라는 용어는 일반적으로 당업계에서 이해되며, 특별 세포 매트릭스(ECM)중에 삽입된 세포를 포함하는 특별한 형태의 밀집한 연결성 조직에 관한 것이다 [Cormack, 1987, Ham's Histology, 9th Ed., J.B. Lippincott Co., pp. 266-272]. 연골의 생화학 조성물은 형태에 따라 다르나, 일반적인 연골의 조성물은 콜라겐, 프로테오글리신 및 물로 구성된 밀집한 ECM으로 포위된 연골세포를 포함한다. 몇몇의 연골의 형태는 당업계에서 이해되고, 예를 들어, 히알라인 또는 관절내에서 발견되는 관절 연골, 매니스커스 및 늑골 부위내에서 발견되는 섬유질 연골 및 탄성 연골을 포함한다. 어떠한 형태의 연골의 생성을 본 발명의 범위내에 있도록 의도되었다.

더욱이, 본 발명이 주로 신체내에서 신규한 연골 조직의 생성 방법에 관한 것임에도 불구하고, 본 발명은 다른 것들 중 그것을 필요로하는 어떠한 포유류, 예를 들어, 말, 개, 고양이, 양, 돼지 체내에서 신규한 연골 조직의 생성을 위해서도 실시할 수 있다. 이러한 동물의 처치는 본 발명의 범위내에 있도록 의도되었다.

본 발명은 단지 상세히 설명하기 위하여 하기와 같은 부분으로 분할하였다: (a) 3차원 골격; (b) 골막/연골막 조직 및 골격과 함께 그의 이식; (c) 유전공학적으로 변형되어 간질 세포를 포함하는 간질 세포 제조; (d) 생체내에서 간질 세포의 투여; (e) 본 발명의 방법을 이용.

3차원 골격

3차원 골격 또는 외곽구조는 (a) 세포를 부착될 수 있고(또는 변형되어 세포가 부착될 수 있는); (b) 세포가 한 층 이상으로 성장될 수 있는 어떠한 물질 및(또는) 모양일 수 있다. 3차원 구조가 생체 안에서 이식되기 때문에, 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 히알루론산, 장선 봉합선, 젤라틴, 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 콜라겐, 면, 또는 다른 천연생성 생체 분해성 물질과 같은 생체 분해성 물질을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 더욱이, 예를 들어, 에틸렌 옥시드로 처리하거나 감마 조사 또는 전자 빔으로 조사하여 이식하기 전에 3차원 구조를 멸균하는 것이 바람직할 수 있다.

또한, 다수의 다른 물질, 예를 들어, 나일론(폴리아미드), 다크론(폴리에스테르), 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물(예를 들어, 폴리비닐클로라이드), 폴리카르보네이트(PVC), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE, 테플론), 써머녹스(TPX), 및 다양한 폴리히드록시알카노에이트를 사용하여 골격 및(또는) 골격 구조를 형성하는데 사용할 수도 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 물질은 3차원 골격으로서 사용될 때, 이들 물질중 특정의 것, 예를 들어, 나일론, 폴리스티렌 등이 세포 부착에 있어서 열등할 수 있기 때문에, 골격에 연골세포 및 다른 간질 세포의 부착을 향상시키기 위하여, 이식하기 전에 골격을 예비처리하는 것이 타당할 것이다. 예를 들어, 나일론 매트릭스는 0.1 M 아세트산으로 처리되고, 폴리리신, PBS 및(또는) 콜라겐중에서 숙성되어 나일론을 코팅할 수 있다. 폴리스티렌은 황산을 사용하여 유사하게 처리될 수 있다.

상기에 열거한 물질중 어떤 것을 메쉬 또는 펠트로 성형하여, 예를 들어, 본 발명이 방법에서 사용하기 위한 3차원 골격 또는 외곽구조를 제조할 수 있다. 골격의 형상에 관계없이, 골격의 개구부를 적절한 크기로하여 연골세포 또는 다른 간질 세포를 개구부를 가로질러 신장시켜야 한다. 골격을 가로질러 신장된 간질 세포의 성장을 활발히 유지시켜, 간질 세포에 의하여 제조된 성장 인자의 생성을 향상시키고, 생체 안에서 신규한 연골의 형성을 추가로 향상시킨다. 또한, 골격의 개구부는 구조내로 및 밖으로 영양소 및 폐 생성물을 적절하게 확산시키고. 이식 부위에서 혈관질화시켜야 한다. 예를 들어, 개구부가 너무 작은 경우, 간질 세포 빠르게 합류점을 획득할 수 있으나, 매트릭스로부터 쉽게 방출될 수 없고; 방출된 세포는 접촉 억제를 나타내고 분열증식을 지지하기 위하여 필요한 적절한 인자의 생성을 중단시킬 수 있다. 개구부가 너무 큰 경우, 간질 세포는 개구부를 가로질러 신장될 수 없고; 이는 또한 분열증식을 지지하기

위하여 필요한 적절한 인자의 간질 세포 생성을 감소시킬 것이다. 메쉬 형태의 골격을 사용할 때, 약 150 내지 약 220 ㎛ 범위의 개구부가 만족스럽다. 그러나, 3차원 구조 및 골격의 복잡함에 따라, 다른 크기도 동일하게 우수하게 작용할 수 있다. 사실상, 간질 세포를 신장시키고 계속해서 복제하고 장 시간 동안 성장시키는 어떠한 형태 또는 구조도 본 발명에 따라 작용할 것이다. 예를 들어, 펠트-형태 구조에 있어서, 약 80 내지 120 ㎛ 범위의 개구부가 바람직하다.

바람직한 태양에 따라서, 골격은 펠트이고, 이는 생체 분해성 물질, 예를 들어, PGA, PLA, 폴리글루코네이트(PLGA) 또는 히알루론산으로 제조된 다중필라멘트실로 구성될 수 있다. 실은 크림핑, 컷팅, 카딩 및 니들링으로 구성된 표준 텍스타일 가공 기술을 사용하여 펠트로 제조된다. 추가의 바람직한 태양에 따라서, 펠트의 다공성은 80 내지 98 %이고, 펠트의 밀도는 30 내지 60 mg/cc이고 펠트의 두께는 1 내지 7 mm이다.

골격이 콜라겐으로 제조된 태양에 있어서, 콜라겐은 스폰지, 브래이드 또는 직조된 쓰레드 등의 형태일 수 있다. 골격이 나일론으로 제조된 태양에 있어서, 간편한 나일론 메쉬는 평균 기공 크기 210 ㎛ 및 평균 나일론 섬유 직경 90 ㎛을 갖는 나일론 여과 메쉬, 니텍스(Nitex)이다(#3-210/36 Tetco, Inc., N.Y.).

출원인이 본 발명이 작용하는 메카니즘에 대해 설명할 아무런 의무도 없음에도 불구하고, 3차원 골격중에 고유한 다수의 인자들이 본 발명에 사용하는데 있어 성공적으로 기여할 수 있다;

(a) 3차원 골격은 단백질 부착, 및 동시에, 생체안에서 간질 세포의 접착을 위하여 보다 큰 표면적을 제공한다.

(b) 상기한 바와 같은 매트릭스의 3차원성으로 인하여, 골격에 부착한 간질 세포는 계속해서 활발히 성장하고 생체안에서 신규한 연골 형성을 촉진시키나, 접촉 억제를 나타내지 못하는 성장 및 조절 인자를 제공한다.

(c) 3차원 골격은 생체안에서 발견되는 것과 유사한 세포 요소의 공간적인 분포를 허용한다.

(d) 3차원 구조중에서 세포 성장에 대한 잠재 부피의 증가는 생체안에서 신규한 연골의 생성에 있어 세포 분화 및 분열에 전도성인 공헌하는 미세환경의 확립을 허용할 수 있다.

(e) 3차원 매트릭스는 이주 세포, 예를 들어, 마크로파지, 단핵 세포 및 가능한 림프구의 이동을 위하여 보다 큰 잠재력을 허용함으로써 세포-세포 상호작용을 최대화한다.

(f) 분화된 세포 표현형의 유지가 성장/분화 인자 뿐만아니라 적절한 세포 상호작용을 필요로 한다는 사실이 이해된다. 본 발명은 생체안에서 조직 미세환경을 효과적으로 개조한다.

본 발명의 하나의 태양에 따라서, 골격은 생체안에서 골격상에 연골세포 및 다른 연골세포의 부착 및 성장을 향상시킬 수 있다. 이식되기 전에특정 물질을 포함하거나 특정 물질로 개질, 예를 들어, 코팅되거나 수정킬 수 있다 . 이들 물질은 세포 성장 인자(예를 들어, TGF-β)와 같은 생체활성제, 연골생성을 촉진시키는 물질(예를 들어, BMP-2, BMP-12 및 BMP-13과 같은 연골 형성을 촉진시키는 BMPs), 골격으로 간질 세포의 이동을 촉진시키는 인자, 매트릭스 침착을 촉진시키는 인자, 소염제(예를 들어, 비스테로이드계 소염제), 면역억제제(예를 들어, 시클로스포린스) 뿐만아니라, 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 그물과 같은 다른 단백질, 헤파린 술페이트, 케라틴 술페이트 등과 같은 글리코단백질 또는 글리코사미노글라칸을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 아스코르베이트를 갖는 TGF-β와 같은 성장 인자는 연골세포에 의하여 연골세포 분화 및 연골 형성을 일으킨다는 사실이 밝혀졌다. 또한, 히알루론산은 연골세포 및 다른 간질 세포의 부착을 위한 우수한 기질이고 골격의 일부분으로서 포함되거나 골격상에 코팅될 수 있다.

또한, 이들 생체활성제는 작용제의 국부, 지지된 방출을 위하여 골격내 및 상에 포함될 수 있다. 이들 지지된 방출제 제재의 예는 생체 활성제 및 생체 적합성 중합체, 예를 들어, 폴리(락트산), 폴리(락트-/-글리콜산), 메틸셀룰로스, 히알루론산, 콜라겐등을 포함하는 합성물을 포함한다. 약제 운반 기구중의 분해성 중합체의 구조, 선택성 및 용도는 문헌 [A. Domb 등의 'Polymers for Advanced Technology' 3 : 279-292, 1992]에 나타나있다. 약제상 제재중의 중합체의 선택성 및 용도에 대한 지시는 문헌 [M. Chasin 및 R. Langer(eds), 1990 'Drugs and Pharmaceutical Science', M. Dekker, New York]에서 찾을 수 있다.

<u>골막/연골막 조직 및 골격과 혼합에서 그의 이식</u>

상기에 기재된 바와 같은 본 발명의 골격은 생체내에서 골막 조직, 연골막 조직 또는 두 조직의 혼합물과 혼합되어 결함 부위에 이식된다. 골막 조직은 뼈의 표면에 위치한 섬유성 막인 골막으로부터 유도되고, 환자 (또는 피실험자) 또는 상호교류가능한 기증자의 임의의 적합한 뼈의 골막/뼈 계면 (예를 들면, 회장, 견갑골, 경골, 비골, 대퇴골 등)으로부터 수득될 수 있다. 골막 조직은 골세포, 연골세포 및 섬유아세포 뿐만 아니라 골형성원성 또는 연골형성원성 세포와 상이하게 하는 퍼텐셜을 갖는 간엽 간세포를 포함하는 다양한 간질 세포를 포함한다. 연골막 조직은 연골막, 관절 표면을 제외한 연골을 덮는 섬유성 연결 조직으로부터 유도된다. 연골막 조직은 연골세포의 선조 세포 및 연골세포를 포함한다.

골막/연골막 조직은 임의의 크기 또는 형태, 바람직하게는 결함 부위에 맞거나 상응하는 크기 및 형태의 조직의 분절 또는 층의 형태일 수 있다. 이 조직은 이식 부위에서 펼쳐져 있거나 골격하에 있을 수 있고, 골격 및(또는) 결함 부위에 봉합선 또는 아교 고정 (예를 들면, 피브린 아교)에 의해 임의로 기계적으로 고정될 수 있다. 골막/연골막 조직이 자가공급 (즉, 이식 받을 환자로부터 유도됨)인 것이 바람직하지만, 이 조직은 다른 공급원에서 유도될 수 있다. 다른 공급원으로부터 유도된 골막/연골막 조직이 사용되는 경우, 결함 부위에 항염 인자 또는 면역억제제를 첨가하여 (예를 들면, 골격내에 부착시키거나 넣거나 또는, 결함 부위에 외부적으로 투여함) 면역 거부의 위험을 최소화하는 것이 바람직하다.

본 발명의 바람직한 실시 태양에 따라, 3차원 골격이 생체내 결함 부위에 이식되고, 골막/연골막 조직의 절편을 이식된 골격 위에 놓고 봉합하여 조직을 덮고, 골격 구조 부근에 위치하도록 한다. 또한, 골막 또는 연골막의 분절이 결함 부위에 직접 이식되고, 골격이 조직 상단 상에 위치될 수 있어서 조직의 간질

세포가 조직으로부터 골격으로 이동할 수 있다. 어떠한 경우에도, 골막/연골막 조직은 간질 세포가 조직으로부터 골격에 이동하고 그 위 및 그 안에서 증식되도록 하기 위하여 골격에 대해 위치돼야 한다. 골격 및(또는) 골막/연골막 조직은 당업계에 공지된 외과 기술 (예를 들면, 관절경)을 사용하여 이식될 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시 태양에 따라, 골막 조직이 위치되거나 배향되어 조직의 골형성층이 결함 부위를 향하도록 하여서, 골격이 결함 부위내에 직접 위치하고 골막 조직이 골격의 상단에 위치한 실시태양에서, 골막 조직이 골격의 상단에 대해 배향하여 골형성층이 골격의 상단을 향하게 된다. 연골막 조직이 청구된 방법에 사용되는 경우, 연골막 조직은 또한 결함 부위내에 위치하거나 골격에 대해 배향되어서 연골막의 골형성 또는 내부 전이층이 결함 부위 또는 골격을 향한다. 연골형성 간세포 및(또는) 연골세포를 포함한 이러한 층은 결함 부위에서 신규한 연골의 생성을 위해 골격내로 이동할 수 있다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 생체흡수성 패취 (예를 들면, 필름, 메쉬 또는 펠트)가 골막/연골막 조직 및 결함 부위내 골격 부근에 위치하거나 배향될 수 있다. 예를 들어 필름이 사용되면, 필름은 PGA 또는 폴리글루코네이트를 포함할 수 있다; 메쉬 또는 펠트가 사용되는 경우에는 비크릴 또는 PLA를 포함할 수 있다. 간질 세포의 제제가 본 명세서에 기재된 바와 같이 결함 부위내에 접종될 수 있다.

본 발명의 다른 실시태양에 따라, 결함 부위는 바람직하게는 이식 전에 결함 부위에서 연골을 저하시키도록 처리하여, 세포 (예를 들면, 간질 세포)를 그 영역으로부터 유리시켜 이식할 골격으로 이동하게 하고, 신규한 연골의 규칙적인 침착을 증진시킨다. 효소가 결함 부위를 처리하기 위해 사용되는 경우, 이러한 효소는 트립신, 키모트립신, 콜라게나아제, 엘라스타아제 및(또는) 히아루로니다아제, 데옥시리보누클레아제, 프로나아제, 콘드로이티나아제 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 연골을 저하시키기 위해 결함 부위를 처리하는 다른 방법은 연마, 괴사조직 제거, 면도 또는 마이크로드릴링을 포함한다. 연마 기술을 사용하는 경우, 연골의 표면이 예를 들면, 쇠솜을 통해 톱니 모양일 수 있다. 마이크로드릴링에서, 드릴 기구는 연골에 작은 흠 또는 채널을 만들기 위해 사용된다. 이미 존재하는 연골을 저하 또는 분쇄하기 위한 결함 부위의 처리는 그 부위에 형성되는 상처 조직의 기회를 감소시키고, 결함 부위에서 신규한 연골의 규칙적인 침착을 증진시킨다.

<u>간질 세포 제제</u>

본 발명의 방법에 따라, 간질 세포의 제제를 이식 부위에 추가로 투여하여 세포가 생체 인자를 생성하여 연골형성원성 및 연골형성 간세포 또는 연골세포 등의 세포의 생체내 골막/연골막 조직을 포함한 이식할 환경 부근으로부터 골막/연골막 상 및 내에 골격을 부착 및(또는) 차별화하도록 이동을 증진시킨다. 간질 세포 제제는 또한 간질 세포 (예를 들면, 연골세포 및(또는) 연골세포의 선조 세포)의 직접적 공급원을 제공하여, 결함 부위에 부착된 골격으로 이동할 수 있게 하고, 결함 부위에서 신규한 연골의 제조를 위해 연골-특이적 거대분자 및 세포외 매트릭스 단백질을 만들어 낸다. 본 명세서에 기재된 세포는 4.4 이하에 기재된 바와 같이, 골격 및(또는) 골막/연골막 조직의 이식 전, 중 또는 후에 투여될 수 있다.

제제의 간질 세포는 간엽 간세포, 섬유아세포, 유사 섬유아세포 및(또는) 폴라겐 II형 및 기타 콜라겐 형을 제조할 수 있고, 연골성 조직에서 전형적으로 제조되는 프로테오글리칸을 포함하는 연골세포, 연골세포의 선조 세포를 포함할 수 있다. 간질 세포는 환자 (또는 피검사자) 또는 상호교류가능한 기증자로부터 수득할 수 있다. 간질을 포함할 수 있는 연골세포, 선조 세포, 유사 섬유아세포 및 기타 세포 및(또는) 요소는 태아 또는 성인이 공급원일 수 있고, 연골, 뼈, 피부, 인대, 건, 근육, 태반, 탯줄 등의 간편한 공급원으로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 연골세포 등의 간질 세포는 초자연골, 늑골 연골, 섬유성 연골 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는 임의의 형태의 연골로부터 유도될 수 있고, 생검 (적절한 부위) 또는 부검에 의해 수득될 수 있다. 연골세포의 선조 세포는 골수, 골막, 연골막 또는 다양한 공급원의 획일적인 사람 간엽조직을 포함한 다양한 공급원으로부터 유도될 수 있다. 섬유아세포는 전(前)피부, 바람직하게는 태아 전피부 또는 임의의 적당한 사체 기관으로부터 편리하게 다량으로 수득할 수 있다. 유사 섬유아세포 및 연골세포의 선조 세포를 포함하는 태아 세포는 탯줄 또는 태반 조직 또는 탯줄 혈액으로부터 수득될 수 있다. 다양한 소스로부터의 간질 세포가 청구된 방법에 사용될 수 있지만, 생체내 이식을 위해서는 이식받을 개개인 또는 '일반적 기증자'로 여겨질 수 있는 태아기원 세포로부터 유도된 간질 세포가 이식의 면역 거부의 위험을 최소화시킨다.

간질 세포는 세포의 공급원으로서 작용하는 적당한 조직을 분리함으로써 쉽게 분리할 수 있다. 이는 당업계의 기술자에게 공지된 기술을 사용하여 쉽게 성취될 수 있다. 예를 들면, 조직을 기계적으로 분리하거나(하고) 이웃 세포간의 연결을 약화시키는 소화 효소 및(또는) 착물화제로 처리하여 조직을 상당한 세포 붕괴없이 개개 세포의 현탁액으로 분산시키는 것을 가능하게 한다. 효소적 해리는 조직을 저미고, 저민 조직을 임의의 다수의 소화 효소 1종 또는 혼합물로 처리함으로써 성취할 수 있다. 이들 소화 효소는 트립신, 키모트립신, 콜라게나아제, 엘라스타아제 및(또는) 히아루로니다아제, 데옥시리보누클레아제, 프로나아제 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 기계적 파열은 그라인더, 블랜더, 시브, 균질기, 압력 셀 또는 초음파기 등을 포함하지만, 이에 제한되는지 않는 다수의 방법으로 성취될 수 있다. 조직 분리 기술로서 문헌 [Freshney, <u>Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique</u>, 2d Ed., A.R. Liss, Inc., New York 1987, Ch. 9 pp 107-126]을 참조한다.

조직을 개개의 세포의 현탁액으로 만든 후, 연골세포, 섬유아세포 및(또는) 기타 간질 세포 및(또는) 요소로부터의 하급 세포집락으로 구획될 수 있는 현탁액을 수득할 수 있다. 이는 또한 클로닝 및 특정 세포 형태의 선택, 원치 않는 세포의 선택적 파괴 (네거티브 선택), 혼합 세포집락에서 상이한 세포 교착성을 기본으로 한 분리, 동결 해동 과정, 혼합 세포집락에서 세포의 상이한 부착성, 여과, 전통적 및 지역적 원심분리, 원심 용출법 (역유동 원심분리), 중력 분리, 역전류 분포, 전기영동 및 형광-활성 세포 분류를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 클론 선택 및 세포 분리 기술에 대해서는 문헌 [Freshney, 상동, Ch. 11 및 12, pp. 137-168]을 참조한다.

예를 들면, 연골세포, 연골세포의 선조 세포, 섬유아세포 또는 유사 섬유아세포의 분리는 다음과 같이 수행된다: 막 채취한 사람 연골 조직을 완전히 세정하고 혈청을 제거하기 위해 행크스 (Hanks) 밸런스드 염 용액 (HBSS)에서 저민다. 저민 조직을 막 제조한 트립신 등의 해리 효소 용액에서 1 내지 12 시간 동안

배양한다. 이러한 배양 후, 해리된 세포를 현탁, 원심분리로 펠렛화시키고, 배양 접시에 깐다. 모든 섬유아세포가 기타 세포 전에 부착되어 적당한 간질 세포가 선택적으로 분리되고 성장한다. 이어서, 분리된 간질 세포를 합쳐진 배양액으로부터 합쳐서 걷어 성장시키고, 생체내 연골 결함 부위에 투여할 수 있다 (예를 들면, 문헌[Naughton 등, 1987, J. Med. 18(344): 219-250). 유사 섬유아세포는 또한 사람 탯줄 (33-44 주)로부터 분리할 수 있다. 신선한 조직을 절편으로 저미고, 다음에 사용할 때까지 배지로 세정하거나 액체 질소에서 신속하게 냉동시킨다. 배꼽 조직은 전술한 바와 같이 분리될 수 있다.

일단 연골세포 또는 연골세포의 선조 세포를 분리한 후, 이들 세포집락을 이식용 세포 제제를 수득하기 위해 시험관에서 유사분열로 증식시킬 수 있다. 가장 적절한 배양 배지, 배지 제제 및 세포 배양 기술의 선택 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 문헌 [Doyle 등, (eds.), 1995, Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures, John Wiley & Sons, Chichester; 및 Ho and Wang (eds.), 1991, Animal Cell Bioreactors, Butterworth-Heinemann, Boston]을 포함한 다양한 곳에 기재되어 있다.

세포는 3 내지 6.5 × $10^4$/㎠ 등의 적합한 밀도에 도달하는 경우, 또는 예를 들면, 배양 접시의 표면 상에 정해진 전면의 백분율에 이르는 경우, 신선한 배지로 이동되거나 '통과되어야'한다. 배양 중, 간질 세포는 배양 용기의 벽에 붙을 수 있고, 거기서 세포는 증식을 계속하여 합쳐진 단일층을 형성한다. 배양 용기내 합쳐진 단일층의 존재가 배양액에서 세포의 성장을 '차단'하는 경향이 있기 때문에, 예를 들면, 신선한 배지를 가진 신규한 배양 용기로 세포의 일부를 이동시켜서 이러한 차단을 예방하거나 최소화시켜야 한다. 합쳐진 단일층의 제거 또는 신규한 용기내 신선한 배지로 세포의 일부의 이동은 통상적으로 세포의 증식 활성을 회복시킨다. 이러한 제거 또는 이동이 약 25 % 융합을 초과하는 단일층을 갖는 임의의 배양 용기에서 행해져야 한다. 또한, 액체 배양액은 세포가 용기 벽에 부착되는 것을 방지하거나 최소화하기 위해 예를 들면, 오비탈 진탕기 위 또는 롤러 병내에서 교반시킬 수 있다.

또한, 간질 세포를 배양한 후, 이들을 시험관내에서 정상적 이동이 요구되는 세포의 연소 배양액 또는 바람직하게는 동결보존된 세포를 포함하는 세포 '은행'에 유지 저장될 수 있다. 세포의 동결보존은 문헌 [Doyle 등, 1995, 상동] 등의 공지된 방법에 따라 수행될 수 있다. 세포는 예를 들면, 약 4 내지 10 × $10^6$ 세포/㎖의 밀도에서, 5 내지 10 % 글리세롤이 있거나 없는 20 % FBS 및 9 % 디메틸술폭사이드 (DMSO)를 추가로 포함하는 배양 배지 등의 '동결 배지'에 현탁될 수 있지만, 이 방법에 제한되는 것은 아니다. 세포는 유리 또는 플라스틱 앰플 (Nunc)에 현탁시키고, 이어서 밀봉하여 프로그램된 냉동기의 냉동실에 넣는다. 최적 냉동 속도는 실험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 냉동 프로그램은 용해열을 통해 -1 ℃/분의 온도 변화가 사용될 수 있다. 일단 앰플이 -180 ℃에 이르면, 액체 질소 영역으로 옮긴다. 냉동보존된 세포는 생육성의 유지를 적어도 5년 마다 검사해야 하지만, 수년 동안 저장할 수 있다.

냉동보존된 세포는 해동시켜 '회복'될 수 있어서, 필요할 때 신규한 연골 조직을 제조하기 위해 사용된다. 해동은 일반적으로 예를 들면, 액체 질소에서 37 ℃ 수조로 앰플을 옮겨서 신속하게 수행해야 한다. 앰플의 해동된 내용물은 10 % FBS 및 5 % ES로 조절된 RPMI 1640 등의 적합한 배지를 함유한 배양 용기에 무균 상태하에서 빨리 이동시켜야 한다. 배양 배지내 세포는 약 3 내지 6 × $10^5$ 세포/㎖의 초기 밀도로 조절하여 세포를 가능한한 빨리 배지 조건으로 하여 분도된 레그 상을 예방할 수 있어서 유리하다. 배양액에서, 세포는 매일 예를 들면, 역현미경으로 세포 증식을 검사하고, 가능한한 빨리 적합한 밀도에 도달하도록 서브배양한다.

연골세포, 연골세포의 선조 세포, 섬유아세포 또는 유사 섬유아세포 뿐만 아니라, 기타 세포도 생체내 이식용 세포 제제에 첨가될 수 있고, 기타 세포는 본 발명의 골격 상 간질 매트릭스의 재생을 돕는다. 예를 들면, 느슨한 연결 조직에서 발견되는 기타 세포는 연골세포 또는 섬유아세포와 함께 접종될 수 있다. 이러한 세포는 내피 세포, 혈관주위세포, 대식세포, 단핵세포, 혈장 세포, 유선 세포, 지방세포 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 간질 세포는 전술한 방법 등의 당업계에 공지된 방법을 사용하여 탯줄 또는 태반 또는 탯줄 혈액을 포함한 적합한 기관으로부터 쉽게 유도될 수 있다.

또한, 간질 세포 제제는 당업계에 공지된 하나 이상의 콜라겐 형태 등의 선택된 세포외 매트릭스 성분을 포함하는 하나 이상의 기타 성분 뿐만 아니라, 성장 인자 및(또는) 약물을 추가로 포함할 수 있다. 세포 제제내 일반적으로 포함될 수 있는 성장 인자는 당업계에 공지되거나 나중에 동정될 하나 이상의 조직 성장 또는 자극 인자가 포함되거나, TGF-β류, 연골 형성을 자극하는 BMP (예를 들면, BMP-2, BMP-12 및 BMP-13), 간질 세포의 이동을 자극하는 인자 및(또는) 매트릭스 침착, 인슐린-유사 증식 인자 (IGF)-Ⅰ 및 -Ⅱ, 성장 호르몬 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 세포 제제에 혼합될 수 있는 약물은 비스테로이드성 항염제 등의 항염성 화합물, 시클로스포린 등의 면역억제제 뿐만 아니라, 국소 마취제를 포함한다. 또한, 다음 성분을 포함하는 기타 성분이 제제에 포함될 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다: (1) 적합한 pH 및 삼투성을 제공하기 위한 완충액; (2) 윤활제; (3) 세포를 투여 부위에 또는 가까이에 보유시키기 위한 점성 물질, 예를 들면, 알기네이트, 한천 및 식물성 고무; 및 (4) 예를 들면, 연골 조직 형성의 증가 또는 변형 또는 연골 조직의 생리화학적 특성 또는 세포의 생육성을 위한 지지 또는 염증 또는 거부의 억제 등의 투여 부위에 바람직한 효과를 나타낼 수 있다.

다시 한 번, 세포가 생체내 이식을 위해 사용되기 때문에 환자 자신의 조직 또는 태아 공급원 ('일반적 기증자')으로부터 간질 세포를 수득하는 것이 바람직하다. 3차원 골격 상 세포의 증식은 구조 상에 또는 단백질 (예를 들면, 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유), 당단백질, 글리코사미노글리칸 (예를 들면, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴-4-술페이트, 콘드로이틴-6-술페이트, 데르마탄 술페이트, 케라틴 술페이트 등) 및(또는) 성장 인자 등의 기타 생체활성 물질로 구조를 코팅하는 것을 포함하여 추가로 증가될 수 있다.

본 발명의 실시태양에 따라, TGF-β 및 아스코르베이트 또는 BMP-2, BMP-12 및 BMP-13 등의 연골 형성을 자극하는 BMP를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 성장 조절 또는 자극 인자는 이식 부위에 신규한 연골의 생성을 증진시키기 위해 골격 및(또는) 골막/연골막 조직의 이식 전, 중 또는 후에 이식 부위에 첨가될 수 있다. 또한, 이러한 성장 조절 인자는 전술한 바와 같이, 분리된 제제로서 또는 간질 세포 제제의 일부로서 간질 세포의 투여시에 이식 부위에 투여될 수 있다.

또한, 간질 세포는 TGF-β 등의 성장 인자 뿐만이 아니라 연골형성을 자극하거나 본 발명의 골격에 연골

세포 및 기타 간질 세포의 이동을 자극하는 인자 등의 생체활성 인자를 유전공학적으로 변형시킬 수 있다.

유전공학적으로 변형된 간질 세포

또한, 본 발명의 골격 및 골막/연골 조직에 투여되거나 배합된 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 결함 부위에서 및(또는) 유전자 치료용으로 연골의 성공적인 제조 또는 재생을 촉진시키는 유전자 생성물을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 항염증성 인자, 예를 들면, 항-GM-CSF, 항-TNF, 항-IL-1, 항-IL-2 등을 발현시키고, 이식의 거부 반응의 위험을 감소시키고, 또는 류머티즘성 질병 또는 다른 염증성 반응으로 인한 연골에서의 퇴행성 변화의 위험을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 인자 (GM-CSF), TNF, IL-1, IL-2, 또는 다른 염증성 세포질을 자극하는 과립성 백혈구-대식 세포 클로니에 대한 항체를 중화시키는 유전자형에 상응하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. IL-1은 프로테오글리칸 및 콜라겐 II, IX, 및 XI형의 합성 [Tyler 외, 1985, Biochem. J. 227:869-878; Tyler 외, 1988, Coll. Relat. Res. 82: 393-405; Goldrimg 외, 1988, J. Clin. Invest. 82:2026-2037; 및 Lefebvre 외, 1990, Biophys. Acta. 1052:366-372]을 감소시키기 위해 제시되어 왔고, IL-1은 연골 재흡수 및 연골세포에 의한 염증성 매개체 제조의 효능 있는 자극제이다 [Campbell 외, 1991, J. Immunol. 147:1238-1246]. 또한, TNF는 IL-1 보다 훨씬 덜 영향을 미친다 할지라도 플로테오글리칸 및 콜라겐 II형의 합성을 억제한다 [Yaron, I. 외, 1989, Arthritis Rheum. 32:173-180; Ikebe, T. 외, 1988, J. Immunol. 140:827-831; 및 Saklatvala, J., 1986, Nature 322:547-549].

일단 유전공학적으로 변형된 간질 세포를 개인에게 이식하면, 항-염증성 유전자 생성물의 존재가 류머티즘성 또는 관절 질병과 관련된 면역 거부 반응 또는 염증성 반응의 향상을 일으킬 수 있다.

또 다른 실시 형태에서, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 치료 효과 (예를 들면, 연골 제조를 자극하기 위한 TGF-β의 제조, 또는 연골 형성을 촉진시키고(거나) 간질 세포의 이동 및(또는) 매트릭스 침전을 촉진시키는 골격 형성 또는 자극성 인자를 억제하기 위한 BMP-13과 같은 다른 인자의 제조)를 발휘하는 유전자를 발현시킬 수 있다.

또한, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 특징이 불완전한 유전자를 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 각종 형태의 류마티즘성 질병 또는 관절 질병 증후를 막거나 개선시키는 유전자는 발현되지 않거나, 질병 상황하에서 하향 조절될 수 있다. 특히, 류마티즘성 질병 또는 관절 질병에 있어 염증성 반응을 막는 것을 포함하는 유전자의 발현이 하향 조절될 수 있다. 대안적으로, 상기 병리학 조건의 일부 또는 전부의 징후, 및 류마티즘성 질병 또는 관절 질병의 최후 전개를 일으켜서 유전자 생성물의 활성을 감소시킬 수 있다. 따라서, 유전자 활성 수준은 존재하는 유전자 생성물의 수준을 증가시키거나, 결함 부위에 존재하는 활성 유전자 생성물의 수준을 증가시킴으로써 증가될 수 있다. 활성 표적 유전자 생성물을 발현시키기 위해 유전공학적으로 변형된 간질 세포를 이 생성물이 결함된 류마티즘성 질병 또는 관절 질병 환자의 결함 부위에 이식함으로써, 표적 유전자 생성물의 수준 및(또는) 이 생성물의 활성은 류마티즘성 질병 또는 관절 질병 증후를 막거나 개선시키도록 조절될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 '표적 유전자'란 표적 유전자 발현의 수준 또는 표적 유전자 생성물 활성 조절이 연골세포에 의한 연골의 재흡수 및 염증성 매개체의 제조를 억제함으로써 류마티즘성 질병 또는 관절 질병을 개선시키도록 작용할 수 있는 방법으로 류마티즘성 질병 또는 관절 질병에 포함된 유전자를 말한다.

또한, 환자는 본 발명의 방법에 의해 투여된 간질 세포에 의해 유전자 교체 치료법으로 치료될 수 있다. 따라서, 교체 또는 재생된 연골은 특히 각 환자의 요구 조건을 충족시키도록 고안될 수 있는데, 예를 들어, 간질 세포는 유전공학적으로 변형되어 1종 이상의 유전자를 조절할 수 있고, 또는 유전자 발현의 조절은 순간적 또는 장기간일 수 있고, 또는 유전자 활성은 유도성 또는 비유도성일 수 있다. 예를 들어, 주인 세포에 의한 이식 세포의 거부 반응을 막는 인간의 보상 조절 단백질을 암호화하는 유전자가 인간의 섬유아세포로 삽입될 수 있다 [McCurry 외, 1995, Nature Medicine 1:423-427].

본 발명의 방법에서 사용된 간질 세포도 또한 유전공학적으로 변형되어 이식 부위에서 염증 또는 거부 반응을 촉진시키는 인자의 발현을 '녹아웃 (knock out)'시킬 수 있다. 표적 유전자 발현 수준 또는 표적 유전자 생성물 활성 수준의 감소를 위한 음 조절 기술이 하기에서 설명된다. 본 명세서에서 사용된 '음 조절'이란 조절 치료가 없을 때의 표적 유전자 생성물의 수준 및(또는) 활성에 비해 표적 유전자 생성물의 수준 및(또는) 활성을 감소시키는 것을 말한다. 간질 세포에 대해 선천적인 유전자의 발현은 많은 기술을 사용하여 감소되거나 녹아웃시킬 수 있는데, 예를 들면, 표준 상동 재조합 기술을 사용하여 완전히 유전자를 불활성 (일반적으로 '넉아웃'이라고 부름)시킴으로써 발현을 억제할 수 있다. 보통, 단백질의 중요한 영역을 암호화하는 엑손 (또는 이 영역에 대한 엑손 5')는 표적 유전자로부터 정상 mRNA의 제조를 막고, 유전자를 불활성시키면서, 양 선택성 마커 (예를 들면, 네오)에 의해 중단된다. 또한, 유전자는 유전자 일부를 삭제하거나 유전자 전부를 삭제함으로써 불활성시킬 수 있다. 게놈과 떨어져 있는 표적 유전자에 있어 두 개의 상동 영역을 갖는 구조를 사용함으로써, 두 개의 영역을 방해하는 서열을 제거할 수 있다 [Mombaerts 외, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084-3087].

표적 유전자의 발현을 억제하는 비전사 및 리보자임 분자가 또한 본 발명에 의해 사용되어 표적 유전자 활성의 수준을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 주요 조직 적합성 유전자 복합체 (HLA)의 발현을 억제하는 비전사 RNA 분자가 면역 반응에 관해 가장 만능인 것으로 제시되어 왔다. 또한, 적당한 리보자임 분자가 문헌 [Haseloff 외, 1988, Nature 334:585-591; Zaug 외, 1984, Science 224:574-578; 및 Zaug 및 Cech, 1986, Science 231:470-475]에 기재된 대로 도안될 수 있다. 또한, 삼중 나선 분자를 표적 유전자 활성을 감소시키는데 이용할 수 있다. 이런 기술은 문헌 [L.G. Davis 외, eds, Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. 1994]에서 상세하게 기재된다.

앞서 말한 기술 중 어떠한 기술을 사용하더라도, IL-1의 발현을 연골세포에서 녹아웃하여 연골세포에 의해 연골의 재흡수 위험 및 염증성 매개체의 제조를 감소시킬 수 있다. 또한, MHC II류 분자의 발현은 이식 세포의 거부 반응의 위험을 감소하기 위해 녹아웃될 수 있다. 유전공학적으로 변형된, 본 발명의 세포에 유용한 방법이 종래 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 이로운 유전자를 함유하는 재조합 DNA 구조 또는 벡터가 구성될 수 있고, 본 발명의 간질 세포를 변형 또는 감염시키는데 사용될 수 있다. 이로운

유전자를 옮기고, 상기 유전자를 발현시킬 수 있는 변형 또는 감염된 세포가 배양균에서 선택되고, 클론으로 확장된다. 이로운 유전자를 함유하는 DNA 구조를 제조하는 방법, 세포를 변형 또는 감염시키는 방법, 및 이로운 유전자를 옮기고 발현시키는 세포를 선택하는 방법이 종래 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Maniatis 외, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel 외, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y.; 및 Sambrook 외, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]에 기재된 기술을 참조하라.

이 세포는 일체 바이러스성 벡터 (예를 들면, 레트로바이러스 벡스 또는 아데노-결합 바이러스성 벡터), 또는 비일체 복제 벡터 (예를 들면, 유두종 바이러스 벡터, SV40 벡터, 아데노바이러스성 벡터), 또는 복제-결함 바이러스성 벡터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 여러 가지 벡터 중 어느 것을 사용하여 생성될 수 있다. 순간적인 발현을 원하는 경우, 비일체 벡터 및 복제 결함 벡터가 바람직할수 있는데, 유도성 또는 구성 증진자가 이런 시스템에서 사용되어 이로운 유전자의 발현을 조절할수 있기 때문이다. 대안적으로, 이로운 유전자가 유도성 증진자에 의해 조절된다면, 일체 벡터를 순간적인 발현을 얻는데 사용할 수 있다. DNA를 세포로 도입하는 다른 방법으로는 리포좀, 리포펙션, 일렉트로포레이션, 입자 분무의 사용, 또는 직접적인 DNA 주입을 포함한다.

주인 세포는 예를 들어, 증진자 또는 촉진자 서열, 전사 종결자, 다른 것 중에서 폴리아데닐화 부위, 및 선택성 마커와 같은 1종 이상의 적당한 발현 조절 요소와 효과적인 결합을 하여 조절되는 DNA로 변형되거나 감염되는 것이 바람직하다.이종 DNA의 도입 후, 생성된 세포가 강화 매질에서 성장하도록 하고, 이어서 선택성 매질로 바꿀 수 있다. 이종 DNA에서 선택성 마커는 선택에 내성을 주고, 세포가 이종 DNA (예를 들면, 플라스미드)를 그의 염샐체로 안정하게 일체시켜 세포주로 클론 및 확장될 수 있는 중심을 형성하도록 성장시킨다. 이 방법은 유전자 생성물을 발현시키는 세포주를 생성하는데 이롭게 사용될 수 있다.

삽입된 유전자의 발현을 유도하기 위해 특정 증진자를 사용할 수 있다. 예를 들어, 바이러스성 증진자는 CMV 증진자/촉진자, SV 40, 유두성 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 엘라스틴 유전자 증진자 및 β-글로빈을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 이로운 유전자의 발현을 조절하는데 사용된 조절 요소는 유전자의 발현을 조절하여 생성물이 생체 내에서 필요할 때에만 합성되도록 해야한다. 순간적인 발현을 원한다면, 구성 증진자가 비일체 및(또는) 복제-결함 벡터에서 사용되는 것이 바람직하다. 대안적으로, 유도성 증진자는 필요시 삽입된 유전자의 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. 유도성 증진자는 일체 및(또는) 복제 벡터로 구성될 수 있다. 예를 들어, 유도성 증진자는 메탈로티오니엔 및 열 쇼크 단백질을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

간질 세포로 생성된 우전자 생성물의 구성 또는 순간적인 발현을 얻기위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Seldon 외, 1987, Science 236:714-718]에 기재된 트랜스카리오틱 이식 기술이 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 '트랜스카리오틱'이란 이식된 세포의 핵이 안정하거나 순간적인 감염에 의한 DNA 서열의 첨가에 의해 변경되는 것을 말한다. 바람직하게는, 간질 세포는 이러한 유전자 생성물을 후-활동 회복 기간 중에 순간적으로 및(또는) 유도성 조절하에서, 간질 세포에 고정된 키메라성 융합 단백질 (예를 들면, 세포외 영역에서 유전자 생성물로 융합된, 수용체 또는 수용체와 같은 분자의 분자내 및(또는) 트랜스멤브레인 영역으로 구성된 키메라성 분자)로 발현시키기 위해 생성된다.

일단 간질 세포가 유전공학적으로 변형된다면, 이들은 환자에게 투여되어 퇴행성 결합 조직 질병 또는 외상의 경우 신규한 연골을 만들 수 있다.

4.4. 생체내로 간질 세포의 투여

간질 세포의 제제는 골격 및(또는) 골막/연골 조직의 이식 전, 중 또는 후에 투여될 수 있다. 예를 들어, 세포를 골격 또는 골막/연골 조직의 이식 전에 결함 부위로 시드할수 있다. 대안적으로, 간질 세포를 골격 및 조직 중 하나 또는 둘다 이식된 후에 부위로 투여될 수 있다 (예를 들면, 골막/연골 조직을 골격으로 봉합한 후 부위로 주입). 하나의 바람직한 실시 형태에서는, 세포를 결함 부위에 있는 골막/연막 조직 및 골격 사이에 시드한다. 또 다른 바람직한 실시 형태에서는, 세포를 골격으로 직접 시드한다. 결함 부위에 있는 연골이 연골을 퇴화시키기 위해 치료되는 본 발명의 실시 형태에서, 간질 세포는 또한 퇴행성 연골로 (예를 들면, 외부 세포로 또는 직접 연골벽으로) 시드될 수 있다. 여기서 간질 세포는 퇴행된 연골에서 이식 세포까지 간질 세포의 이동을 유도하도록 작용한다.

간질 세포는 결함 부위로 세포를 투여하는 방법, 예를 들어, 주입에 의해 시드될 수 있다. 세포가 이 부위로 주입될 때, 이러한 주입은 세포의 생존력을 유지하는 방법, 예를 들면, 주사기로, 또는 더 바람직하게는 관절 촬영 내시경으로 달성될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서는, 투여된 세포수는 대략 $1\times10^6$ 내지 $3\times10^6$ 간질 세포의 범위일 수 있다.

골격, 골막/연골 조직 및 간질 세포의 이식 후, 결함 부위를 외과적으로 봉한다. 본 발명의 바람직한 실시 형태에서는, 시드될 간질 세포를 환자로부터 (예를 들면, 귀 연골 및(또는) 뼈 골수로부터) 각각의 외과적인 방법으로 외과적으로 얻고, 생체 내에서 적당한 양의 세포를 얻도록 배양하고, 골격 및 골막/연골 조직이 이식되는 두 번째 수술 시에 환자에게 투여된다. 조직이 이식 이전에 생체 내에서 배양될 수 있다 하더라도 골막/연골 조직은 바람직하게는 골격이 이식될 시에 환자로부터 외과적으로 얻어진다 [예를 들어, O'Driscoll 외, 1994, J. Bone and joint Surg. 76-A:1042-1051 참조].

본 발명의 방법에 의해, 골막/연골 조직 및 첨가된 간질 제제로부터의 간질 세포는 결함 부위에서 신규한 연골을 제조하게 하는, 생체 내에서 연골 조직의 미세 환경과 유사한 간질 매트릭스를 형성하도록 골격 구조를 위치시킨다. 이 부위에 투여된 간질 세포는, 연골 형성, 및 결함의 생체 내 연골 환경인 이식된 조직이나 간질 제제로부터의 간질 세포의 골격으로의 이동을 촉진시키는 중요한 생물학적 인자를 제공해서 지지체, 성장 인자, 및 생체내 간질 세포의 장기간 활성 분열 증식을 유지하는데 필요한 조절 인자를 제공하는 생 간질 조직의 제조를 촉진한다. 간질 세포는 결함 부위에 활기 있는 간질 매트릭스의 침전을

촉진하는 인자를 추가로 제공한다. 분열 증식 세포는 생체내 결함 부위에서 신규한 연골 조직을 형성하기 위해 매트릭스 내에서 적당하게 성숙하고, 분열한다.

신규한 연골 조직이 재생 부위에서 적절히 고정될 수 있다면 손상된 연골의 성공적인 재생 또는 대체를 강화할 수 있다. 사전 고정 기술을 사용하지 않는다면, 후-이식 이동은 신규한 연골 조직이 이 부위로부터 제거되게 할 수 있다. 이 부위에 놓고 봉합할 수 있는, 생체 재흡수성 고분자 또는 생체 상용성 조직으로부터 유도된 팻치; 생체 흡수성 봉합 또는 그 밖의 패스너 (예를 들면, 핀, 스태플, 압정, 나사, 앵커, 피브린 글루와 같은 글루); 비흡수성 고정 도구 (예를 들면, 봉합, 핀, 나사 및 앵커); 접착제; 및 간섭 피트 기하학의 사용을 포함하는 다양한 방법이 신규한 연골 조직을 적당히 고정시키는데 사용될 수 있다.

4.5. 본 발명의 방법의 용도

본 발명의 방법은 생체내 존재하는 연골 조직을 대체 또는 증가시키는데, 새롭고 변형된 연골 조직을 도입하는데, 또는 생물학적인 조직 또는 구조물을 합께 결합시키는데 유용하다. 본 방법은 많은 특정 영역에서의 용도를 발견하였다. 예를 들어, 무릎, 히프, 팔목, 손목 및 관절 와상 완골의 관절을 포함하는 몇몇 관절에서의 관절 연골의 내부 장애의 평가가 관절 촬영 내시경 기술로 가능했다. 이런 장애는 연골의 물리적인 외상에 의해, 여러 연결 조직 질병에 의해 및(또는) 개인 연령의 증가에 의해 발생될 수 있다. 관절 촬영 내시경 수술은 성공적일 뿐만 아니라 점점 대중적으로 되고 있는데, 예를 들어, 직경 3 내지 4 mm의 수많은 작은 절단기들이 무릎에 사용될 수 있다. 수술 도구들이 관절 촬영 내시경에 의해 제공되는 광학 분야로 들어가는 3각 측량은 다중 입구를 필요로하지만, 대안적으로, 절단기는 관절에서 오직 하나의 통로만을 필요로하는 관절 촬영 내시경 그 자체의 채널을 통해서 통과할 수 있다 [Jackson, R.W., 1983, J. Bone Joint Surg. [AM] 65:416]. 관절 촬영 내시경 수술로부터 손상되거나 악화된 연골의 선택적인 제거는 연골 손상을 일으키는데, 이것이 본 발명의 방법을 사용하여 재생될 수 있다. 또한, 본 방법은 다른 형태 관절의 주요한 재구성 수술로부터 생긴 연골 손상을 재생 또는 증대시키는데 사용될 수 있고, 수술 방법은 문헌 [Resnick, D., 및 Niwayama, G., eds., 1988, Diagnosis of Bone and Joint Disorders, 2d ed., W.B. Sanders Co.]에 기재되어 있다. 또한, 본 방법은 얼굴 및 두개골 재구성 뿐만 아니라 측두골의 하악골 관절의 재구성에도 유용하다.

본 발명은 류마티즘성 질병 또는 골관절염과 같은 퇴행성 연결 조직 질병의 치료에, 또는 연골이 손상되거나 손실되는 물리적인 외상 치료에 있어, 생체 내에서 연골의 제조 또는 재생에 유용하다.

## *실시예*

하기 소구분은 본 발명의 방법에 의한 연골 결함 부위에 있는 골격, 골막 조직 및 간질 세포의 생체내 이식 뿐 아니라 본 발명의 방법에서 사용된 성분을 설명한다.

1. 입체 골격의 제조

PGA 멀티필라멘트 섬유로부터 유도된 펠트를 포함하는 입체 골격을 생성하였다. 이 섬유는 데이비스 및 객/쉐우드 메디칼 (Davis and Geck/Sherwood Medical)사로부터 상표명 덱손 (Dexon™)으로 시판중이다. 덱손 섬유의 특정 형태는 56/123이다. 덱손 섬유는 표준 섬유 가공 기술을 통해 펠트로 가공된다. 가공 후, 가공률 97 %, 밀도 45mg/cc 및 두께 2 내지 7 mm를 갖는 펠트 시트를 생체내 이식을 위해 적당한 크기로 자른다. 의학 생성물의 표준 멸균 기술 (방사선 또는 산화 에틸렌 가스)이 펠트를 멸균하는데 사용된다. 펠트는 10 % 태아 보빈 혈청, 2 mM L-글루타민, 비필수 아미노산, 50 mg/ml 프롤린, 1 mM 나트륨 피루베이트, 35 ㎍/ml 젠타마이신 술페이트 및 50 ㎍/ml 아스코르베이트를 함유하는 DMEM 매질을 사용하여 건조 이식시키거나 미리 스며들게 할 수 있다.

2. 골막/연골 조직의 제조

본 발명의 방법에서 사용되는 골막 조직은 예를 들면, 관절 촬영 내시경에 의해 환자의 경곡 또는 대퇴골로부터 골막 부분을 제거함으로써 얻어진다. 연골 조직은 환자의 늑골로부터 연골 부분을 제거함으로써 얻어질 수 있다. 골막/연골 조직은 결함 부위와 비슷한 크기 및(또는) 모양이다. 환자의 골막/연골 조직의 절단은 골격 이식시에 수행되는 것이 바람직하다.

3. 간질 세포 제제의 제조

인간 연골세포 제제가 문헌 [Brittberg 외, 1994, New Eng. J. Med. 331 (No. 14):890-895]에 기개된 대로 얻어진다. 예를 들어, 연골 조각 (예를 들면, 300 내지 500 중량mg)은 무릎의 대퇴부 관절구와 같은 관절의 중요치 않은 하중-발생 부위로부터 관절 촬영 내시경에 의해 얻어질 수 있다. 연골 조직을 염화나트륨 (부피 당 0.9 중량%)의 냉각 멸균 용액에 놓고, HEPES 완충 용액 (10 mmol/l), 젠타마이신 술페이트 (50 ㎍/ml), 암포테리신 B (2 ㎍/ml), 및 L-아스코르브산 (50 ㎍/ml)을 함유하는 Ham's F12 매질 (기브로 랩스 (Gibro Labs)사 제품, 뉴욕 그랜드섬 소재)에서 잘게 썰고 세척함으로써 2 내지 5 시간 안에 세포를 모을 수 있다. 비슷하게, 문헌 [supra. 5.1 절]에 기재된 완전한 DMEM 매질을 사용하여 세포를 모은다. 이어서 연골을 콜라게나제 (0.2 중량%/부피)로 약 16 시간 동안 소화시키고, 이 세포를 나일론 메쉬로 여과하고, 매질로 세척하고, 환자의 혈청이 보충된 매질에 재현탁시킨다. 이 세포를 T-150 플라스크 당 약 $1\times10^6$ 세포의 밀도로 시드하고, 37 ℃, 5 % $CO_2$의 인큐베이터에서 배양시킨다. 매 5 내지 7 일 마다 세포를 합류점에 통과시킨다.

또한, 문헌 [Wakitani 외, 1994, J. Bone 및 Joint Surg. 76-A (No. 4):579-592]에 기재된 비슷한 방법을 사용하여 연골 선조 세포를 얻을 수 있다. 간단히, 혈액을 뼈 골수로부터 흡입하고, 흡입물은 세척해서 5 분 동안 180×g에서 원심 분리한다. 10 % FCS 및 항생 물질이 보충된 Ham's F12 매질에서 재현탁시킨 후, 붉은 혈액 세포를 4 % 아세트산으로 처리하여 분쇄하고, 잔류 세포를 습윤 대기, 5 % $CO_2$에서 37 ℃의 완전한 매질 중에서 배양하였다. 5일 후, 매질을 바꾸는데, 이것은 실질적으로 모든 비접착성 세포를 제거한다. 접착성 세포는 합류점까지 단일층으로 성장한다. 이어서, 세포를 5 분 동안 트립신화하고

(0.25 % 트립신, 1 mM EDTA), 이 세포를 배양 접시로부터 방출한다.

또한, 연골 선조 세포를 모아진 골막 (예를 들면, 경골 또는 대퇴골)로부터 얻을 수 있다. 골막 조직은 주기적인 교반을 하면서, 37 ℃에서 3 시간 동안 Ham's F12 매질에서 0.24 % 콜라게나제와 함께 배양한다. 이어서, 이 조직을 와동에 의해 분쇄하고, 이 세포를 100 ㎛ 니텍스 (Nitex) 여과기로 여과하고, 2번 세척해서 원심 분리한다. 이어서, 이 세포를 완전한 매질에서 배양하고, 이를 격일로 교환한다. 접착성 세포가 합류점까지 성장되어서, 뼈 골수 유도 세포에 대해 상기 설명된 바와 같이 트립신과 함께 배출된다.

생체내로 투여되기 전에, 간질 세포 제제를 트립신으로 처리하여 현탁시키고, 원심 분리하고, 펠렛은 자가 이식한 혈청으로 보충된 배양 매질 중에서 세척한다. 이어서, 세포 제제를 이식 부위로 투여하기 위해 1.2 mm 니들을 갖는 1 ml 투베르쿨린 주사기로 빨아들인다.

4. 생체내 골격, 골막 조직 및 간질 세포의 이식

연골 결함 부위를 멸균 용액 (예를 들면, 0.75 % 적정 가능한 요오드와 같은 요오드 수술용 스크럽, 또는 0.9 % 염화 나트륨 용액)으로 스크럽 또는 세척하여 이식 전에 손질/멸균시킨다. 또한, 사용된 효소 농도에 따라 1 내지 30 분 동안 0.1 내지 100 단위체/ml 영역의 트립신으로 처리하여 결함이 있는 연골 표면 부분을 붕괴시키도록 효소 처리한다.

상기 설명된, 결함 부위에 맞도록 만들어진 펠트 골격을 이 부위에 놓고, 상기 설명된 골막 조직을 골격과 마주하고, 결함 부위로 골막의 형성층을 갖는 펠트 골격의 위에 놓는다. 골막 조직은 임의로 재흡수성 비크릴 구조를 사용하여 펠트 골격의 끝에 봉합된다. 또한, 플랩은 결함 부위에 있는 주변 연골에 봉합된다.

골격 및(또는) 골막 조직의 이식 전에, 상기 설명된 제제의 간질 세포를 관절 촬영 내시경에 의해 결함 부위로 투여할 수 있다. 두께 5 mm 및 직경 1.5 cm 의 결함에 대해, DMEM (혈청의 존재 또는 부재)과 같은 영양물-기재 용액 200 ㎕ 중에 총 간질 세포 $14\times10^{6}$를 투여한다. 바람직한 실시 형태에서는, 간질 세포를 골막 조직 및 골격 사이에 주입한다. 결함 부위를 봉합선으로 층으로 밀폐하고, 이 부위를 붕대로 감는다. 수술후 진통제를 투여할 수 있다.

본 발명은, 본 발명의 각 특성의 하나의 예로 설명된 특정 실시 형태의 범위에 한정되지 않고, 본 명세서에서 제시되고, 설명된 것과 함께 기능상 동일한 방법 및 성분은 앞의 설명으로부터 종래 기술의 숙련자에게 명백하게 될 것이다. 이런 변형은 첨부된 청구항의 범위 안에 들어간다.

## *(57) 청구의 범위*

### 청구항 1

골막 조직, 연골막 조직 또는 상기 조직들의 배합물과 합해진 생체 적합성, 무생 3차원 골격 구조의 간질 세포 제제와 병용되는 연골 이식에 이어 연골을 생성시키기 위한 용도.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 간질 세포가 골격에 부착되고(되거나), 또는 간질 세포의 연골형성 또는 이동을 일으키는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 골막 조직 또는 연골막 조직이 골격의 상단 또는 하단에 골격과 인접하게 놓여지는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 조직으로부터 나온 간질 세포가 조직에서 골격으로 이동할 수 있도록 골막 조직 또는 연골막 조직이 골격에 대해 놓여지는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 조직의 형성층 또는 내부 전이층이 골격과 마주대할 수 있도록 골막 조직 또는 연골막 조직이 골격에 대해 놓여지는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 간질 세포 제제가 골격과, 골막 조직 또는 연골막 조직 사이에 물리적으로 배치되는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 골격 구조가 생체 분해성이거나 또는 비생체 분해성인 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 생체 분해성 물질이 폴리글리콜산, 폴리락트산, 면, 장선 봉합선, 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 젤라틴, 콜라겐 또는 폴리히드록시알카노에이트인 것을 특징으로 하는 용도.

### 청구항 9

제7항에 있어서, 비생체 분해성 물질이 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플루오르에틸렌, 써머녹스, 면, 셀룰로스 또는 폴리히드록시알카노에이트인 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 외곽구조가 펠트 또는 메쉬인 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 이식 전에 골격을 산화 에틸렌 또는 전자 빔으로 처리하는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 골격이 이에 대한 간질 세포의 부착 또는 성장을 증가시킬 수 있는 물질 1종 이상을 포함하거나, 또는 포함하도록 변형되는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 물질이 (a) 세포 성장 인자, 간질 세포의 이동을 촉진시키는 인자, 연골형성을 촉진시키는 인자, 매트릭스 침착을 촉진시키는 인자, 소염제 및 면역억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성제이거나, 또는 (b) 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴-4-술페이트, 콘드로이틴-6-술페이트, 데르마탄 술페이트, 케라틴 술페이트 및 히알루론산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 용도.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 생체활성제가 (a) 아스코르베이트가 있거나 없는 TGF-β이거나, 또는 (b) 연골형성을 촉진시키는 뼈 형태발생적 단백질이거나, 또는 (c) 서방제형을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 서방제형이 생체활성제 및 생체 적합성 중합체의 복합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 생체 적합성 중합체가 폴리락트산, 폴리(락틱-코-글리콜산), 메틸셀룰로스, 히알루론산 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 간질 세포 제제가 연골세포, 연골세포의 선조 세포, 섬유아세포 또는 섬유아세포 유사 세포, 또는 연골세포, 연골세포의 선조 세포, 섬유아세포, 섬유아세포 유사 세포, 내피 세포, 혈관주위세포, 대식세포, 단핵세포, 백혈구, 원형질 세포, 비만 세포, 지방조직 세포, 제대 세포 또는 제대 혈액으로부터의 골수 세포의 배합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 연골세포의 선조 세포가 간엽 간 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 간질 세포 제제가 1종 이상의 생체활성제를 더 포함하거나, 또는 상기 세포가 1종 이상의 생체활성제를 생성시키기 위해 유전공학적으로 변형되는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 생체활성제가 세포 성장 인자, 간질 세포의 이동을 촉진시키는 인자, 연골형성을 촉진시키는 인자, 매트릭스 침착을 촉진시키는 인자, 소염제 및 면역억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 생체활성제가 아스코르베이트가 있거나 없는 TGF-β이거나, 또는 연골형성을 촉진시키는 뼈 형태발생적 단백질인 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 22**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제제의 간질 세포를 유전공학적으로 변형시켜 생체 내에서 불충분하게 발현되는 유전자를 발현시키거나, 또는 간질 세포에 의해 정상적으로 발현되는 유전자의 발현을 방지하거나 또는 감소시키는 것을 특징으로 하는 용도.

**청구항 23**

(a) 골막 조직, 연골막 조직 또는 상기 조직들의 배합물과 합해진 생체 적합성, 무생 3차원 골격 구조를 결함 부위에 이식하고,

(b) 골격에 부착시키기 위해(위하거나), 연골형성, 또는 결함 부위에 인접한 생체 내 환경으로부터 골격

으로 간질 세포의 이동을 일으키기 위해 결함 부위에 간질 세포 제제를 추가로 투여하는 것을 포함하는 생체 내 연골 결함 부위에서 연골의 생성 방법.

**청구항 24**

골격을 결함 부위에 이식시키고, 골막 또는 연골막 조직을 골격의 상단에 골격과 인접하게 배치시키는 제1항 기재의 방법.

**청구항 25**

골막 또는 연골막 조직을 결함 부위에 이식시키고, 골격을 조직의 상단에 조직과 인접하게 배치시키는 제1항 기재의 방법.

**청구항 26**

조직으로부터 나온 간질 세포가 조직에서 연골로 이동할 수 있도록 골막 조직 또는 연골막 조직을 골격에 대해 위치시키는 제1항 기재의 방법.

**청구항 27**

조직의 형성층이 골격과 마주대하도록 골막 조직을 골격에 대해 위치시키는 제1항 기재의 방법.

**청구항 28**

조직의 형성층 또는 내부 전이층이 골격과 마주대하도록 연골막 조직을 골격에 대해 위치시키는 제1항 기재의 방법.

**청구항 29**

골격 구조를 이식하기 전, 이식하는 동안 또는 이식한 후에 간질 세포 제제를 투여하는 제1항 기재의 방법.

**청구항 30**

골막 또는 연골막 조직을 이식하기 전, 이식하는 동안 또는 이식 한 후에 간질 세포 제제를 투여하는 제1항 기재의 방법.

**청구항 31**

간질 세포 제제를 골격과, 골막 조직 또는 연골막 조직 사이에 물리적으로 배치시키는 제1항 기재의 방법.

**청구항 32**

제23항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 골격 구조가 생체 분해성 물질 또는 비생체 분해성 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 생체 분해성 물질이 폴리글리콜산, 폴리락트산, 면, 장사 봉합선, 셀룰로스, 니트로셀룰로스, 젤라틴, 콜라겐 또는 폴리히드록시알카노에이트인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 34**

제32항에 있어서, 비생체 분해성 물질이 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플루오르에틸렌, 써머녹스, 면, 셀룰로스 또는 폴리히드록시알카노에이트인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 35**

제23항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 외곽구조가 펠트 또는 메쉬인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 36**

제23항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 이식 전에 골격을 산화 에틸렌 또는 전자 빔으로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 37**

제23항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 골격이 이에 대한 간질 세포의 부착 또는 성장을 증가시킬 수 있는 물질 1종 이상을 포함하거나, 또는 포함하도록 변형되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 물질이 (a) 세포 성장 인자, 간질 세포의 이동을 촉진시키는 인자, 연골형성을 촉진시키는 인자, 매트릭스 침착을 촉진시키는 인자, 소염제 및 면역억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 생체활성제이거나, 또는 (b) 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴-4-술페이트, 콘드로이틴-6-술페이트, 데르마탄 술페이트, 케라틴 술페이트 및 히알루론산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 생체활성제가 (a) 아스코르베이트가 있거나 없는 TGF-β이거나, 또는 (b) 연골형성을 촉진시키는 뼈 형태발생적 단백질이거나, 또는 (c) 서방제형을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 서방제형이 생체활성제 및 생체 적합성 중합체의 복합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 생체 적합성 중합체가 폴리락트산, 폴리(락틱-코-글리콜산), 메틸셀룰로스, 히알루론산 및 콜라겐으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 42**

제23항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 간질 세포 제제가 연골세포, 연골세포의 선조 세포, 섬유아세포 또는 섬유아세포 유사 세포, 또는 연골세포, 연골세포의 선조 세포, 섬유아세포, 섬유아세포 유사 세포, 내피 세포, 혈관주위세포, 대식세포, 단핵세포, 백혈구, 원형질 세포, 비만 세포, 지방조직 세포, 제대 세포 또는 제대 혈액으로부터의 골수 세포의 배합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 연골세포의 선조 세포가 간엽 간 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 44**

제23항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 간질 세포 제제가 1종 이상의 생체활성제를 더 포함하거나, 또는 상기 세포가 1종 이상의 생체활성제를 생성시키기 위해 유전공학적으로 변형되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 생체활성제가 세포 성장 인자, 간질 세포의 이동을 촉진시키는 인자, 연골형성을 촉진시키는 인자, 매트릭스 침착을 촉진시키는 인자, 소염제 및 면역억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 생체활성제가 아스코르베이트가 있거나 없는 TGF-β이거나, 또는 연골형성을 촉진시키는 뼈 형태발생적 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 47**

제23항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 제제의 간질 세포를 유전공학적으로 변형시켜 생체 내에서 불충분하게 발현되는 유전자를 발현시키거나, 또는 간질 세포에 의해 정상적으로 발현되는 유전자의 발현을 방지하거나 또는 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.