(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049890
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) *A61L 27/24* (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01) *C12P 1/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3687 (2013.01)
A61L 27/24 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7012330(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년04월27일
심사청구일자 2020년04월28일
(62) 원출원 특허 10-2020-7001116
원출원일자(국제) 2012년04월27일
심사청구일자 2020년01월14일
(85) 번역문제출일자 2020년04월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/035361
(87) 국제공개번호 WO 2012/149253
국제공개일자 2012년11월01일
(30) 우선권주장
61/479,937 2011년04월28일 미국(US)

(71) 출원인
라이프셀 코포레이션
미국 07940 뉴저지주 매디슨 기랄다 팜스 5
(72) 발명자
첸, 이
미국, 뉴저지 08648, 라우렌스빌, 62 캐널 뷰 드라이브
(74) 대리인
허용록

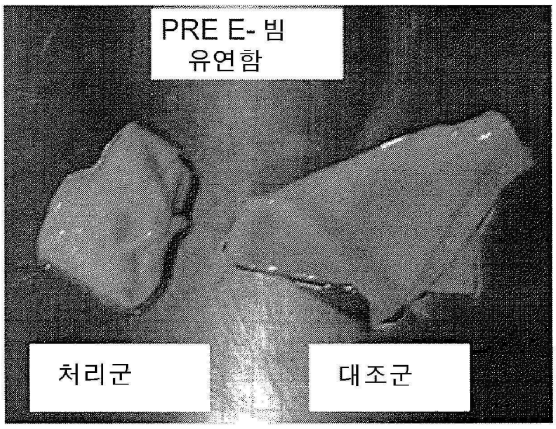
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **조직 생성물의 효소처리방법**

(57) 요 약

본 발명은 조직 매트릭스를 처리하는 방법 및 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 조직 매트릭스에 관한 것으로서, 상기 방법은 조직 매트릭스의 원하는 유연성을 생성하기 위해 조직 매트릭스를 단백질분해 효소로 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61L 27/3604 (2013.01)
A61L 27/362 (2013.01)
A61L 27/3625 (2013.01)
A61L 27/3629 (2013.01)
A61L 27/3695 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
C12P 1/00 (2013.01)
A61L 2430/40 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

진피 조직을 선택하는 단계;

상기 진피 조직을 무세포화 용액으로 처리하여 진피 조직으로부터 세포 및 세포성분들을 제거하여 무세포 진피 매트릭스를 제조하는 단계; 및

상기 무세포 진피 매트릭스를 단백질분해 효소를 포함하는 용액과 접촉시켜, 진피 조직 내에서 단백질의 부위-특이적 제거를 야기하는 단계를 포함하는, 진피 조직을 처리하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 단백질분해 효소는 브로멜라인인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단백질분해 효소는 브로멜라인, 파파인, 피신, 악티니딘 또는 이들의 조합들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

진피 조직을 선택하는 단계;

상기 진피 조직을 무세포화 용액으로 처리하여 진피 조직으로부터 세포 및 세포성분들을 제거하여 무세포 진피 매트릭스를 제조하는 단계; 및

상기 무세포 진피 매트릭스를 단백질분해 효소를 포함하는 용액과 접촉시켜, 진피 조직 내에서 단백질의 부위-특이적 제거를 야기하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된, 무세포 진피 조직 매트릭스.

청구항 5

제 4항에 있어서, 단백질분해 효소는 브로멜라인인 것을 특징으로 하는, 무세포 진피 조직 매트릭스.

청구항 6

제 4항에 있어서, 단백질분해 효소는 브로멜라인, 파파인, 피신, 악티니딘 또는 이들의 조합들로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 무세포 진피 조직 매트릭스.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2011년 4월 28일 출원된 미국 가출원번호 제61/479,937호에 대하여, 35 U.S.C.§ 119에 근거하여 우선권을 청구한다.

[0002] 본 발명은 조직 매트릭스, 및 특히 매트릭스를 단백질분해 효소로 처리함으로써 조직 매트릭스의 유연성을 조절하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 죽거나 또는 손상된 조직들 및 기관들을 재생, 복구 또는 그렇지 않으면 처리하기 위해, 다양한 조직-유도된 생성물들이 사용된다. 상기 생성물들은 온전한 조직 이식 및/또는 무세포 조직 또는 재건된 무세포 조직들(예를 들면, 세포 시딩과 함께 또는 세포 시딩 없이, 피부, 소장 또는 다른 조직들로부터의 무세포 조직 매트릭스)을 포함할 수 있다. 상기 생성물들은 보통 조직 공급원(즉, 기원한 동물 및 조직 타입) 및 조직 생성물을 생성하기 위해 사용되는 프로세싱 변수들에 의해 결정되는 기계적인 특성들을 가진다. 조직 생성물은 종종 수술용도 및/

또는 조직 대체 또는 증강에 사용되기 때문에, 조직 생성물의 기계적인 특성들은 중요하다. 예를 들면, 외과의사들은 일반적으로, 보다 자연스럽게 느껴지고/느껴지거나 수술과정 중에 취급하기 쉬운 조직들을 선호한다. 그러나, 일부 조직 생성물은 원치 않게 강성을 띄며, 부자연스러운 느낌을 가진다. 따라서, 보다 바람직한 기계적 특성들을 생성하기 위해 조직 생성물을 처리하는 방법들이 제공된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 조직 생성물의 효소처리방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 특정 구체예에 따르면, 조직 매트릭스를 처리하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 콜라겐-함유 조직 매트릭스를 선택하는 단계 및, 조직 매트릭스 내 원하는 수준의 유연성을 생성하기에 충분한 조건하에, 조직 매트릭스를 단백질분해 효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0006] 다른 구체예에서, 조직 매트릭스를 처리하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 콜라겐-함유 무세포 조직 매트릭스를 선택하는 단계 및, 조직 매트릭스 내 원하는 수준의 유연성을 생성하고 조직 매트릭스의 다공성을 증가시키기에 충분한 조건하에, 조직 매트릭스를 단백질분해 효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0007] 일부 구체예에서, 무세포 조직 매트릭스가 제공된다. 매트릭스는 무세포 조직 매트릭스를 선택하는 단계 및, 조직 매트릭스 내 원하는 수준의 유연성을 생성하기에 충분한 조건하에, 조직 매트릭스를 단백질분해 효소와 접촉시키는 단계를 포함하는 프로세싱에 의해 제조될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 방법을 사용하여 효소처리한 후의 무세포 조직 매트릭스뿐만 아니라 처리되지 않은 대조군을 나타낸다.

도 2는 처리된 샘플 및 대조군 샘플에 대한 인장강도 시험데이터의 박스 플롯이다.

도 3은 처리된 샘플 및 대조군 샘플에 대한 봉합강도 시험데이터의 박스 플롯이다.

도 4는 처리된 샘플 및 대조군 샘플에 대한 인열강도 시험데이터의 박스 플롯이다.

도 5는 처리된 샘플 및 대조군 샘플에 대한 콜라게나제 소화 시험데이터의 박스 플롯이다.

도 6은 처리된 샘플 및 대조군 샘플에 대한 크리프 내성 시험데이터의 박스 플롯이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명에 따른 특정의 예시적인 구체예들이 참고될 것이며, 이들 중 특정 실시예들은 첨부된 도면들에 설명되어 있다. 가능하다면, 도면을 통해 동일하거나 유사한 부분들에 대하여는 동일한 참조번호들이 사용될 것이다.

[0010] 본원에서, 특별히 다르게 진술하지 않는 한, 단수 사용은 복수를 포함한다. 본원에서, "또는"이라는 용어는 다르게 진술하지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 그리고, "포함하는"이라는 용어뿐만 아니라 "포함한" 및 "포함된다"와 같은 다른 형태를 사용하는 것은 제한되지 않는다. 본 명세서에 설명된 범위는 종점들 및 종점들 사이의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0011] 본 명세서에 사용된 단락 제목은 조직적인 목적을 위한 것일 뿐, 설명되는 주제를 한정하는 것으로 간주되지 않는다. 특허, 특허출원, 논문, 서적 및 협약을 포함하며, 여기에 제한되지 않는, 본원에 인용된 모든 문헌들 또는 문헌들의 일부는 이후에 특정 목적을 위해 참고문헌으로 전문 통합된다.

[0012] 본원에 사용된 "조직 생성물"은 세포외 매트릭스 단백질을 함유하는 임의의 인간 또는 동물 조직들을 의미할 것이다. "조직 생성물"은 무세포 또는 부분 무세포화된(decellularized) 조직 매트릭스, 외인성 세포들에 의해 재증식된 무세포화된 조직 매트릭스, 및/또는 조직의 세포외 매트릭스 내 콜라겐 섬유들의 적어도 일부의 배향을 변경시키기 위해 처리된 세포 조직들을 포함할 수 있다.

[0013] 환자들을 치료하기 위한 생성물을 제조하기 위해, 다양한 인간 및 동물 조직들이 사용될 수 있다. 예를 들면, 다양한 질병들 및/또는 구조적 손상들(예를 들면, 트라우마, 수술, 위축 및/또는 장시간 마모 및 분해)로 인해

손상 또는 손실된 인간 조직들을 재생, 복구, 증가, 강화 및/또는 치료하기 위한 다양한 조직 생성물들이 생성되어 왔다. 상기 생성물들은 예를 들면, 무세포 조직 매트릭스, 조직 동종이식 또는 이종이식, 및/또는 재구성된 조직들(즉, 생존가능한 물질들을 제조하기 위해 세포들이 심어진 적어도 부분적으로 무세포화된 조직)을 포함할 수 있다.

[0014] 수술 적용을 위해, 특정 기계적 특성들을 갖는 조직 생성물을 제조하는 것이 종종 바람직하다. 예를 들면, 재료의 시트를 포함할 수 있는 조직 생성물은 의도된 용도를 견디기에 충분한 강도를 가져야 한다. 예를 들면, 특정 조직 생성물은 결함들(예를 들면, 헤르니아)을 복구하기 위해, 주위 조직들 또는 이식물들(예를 들면, 유방확대 및/또는 재건용)을 지지하기 위해, 또는 손상된 또는 손실된 조직(예를 들면, 트라우마 또는 수술 절제 후)을 대체하기 위해 사용될 수 있다. 특정 용도가 무엇이든지, 조직 생성물은 조직이 재생 및/또는 복구가 일어날 때까지 기능하도록 충분한 강도, 탄성 및/또는 다른 기계적 특성들을 가져야 한다.

[0015] 그리고, 조직 생성물은 바람직한 느낌을 가져야 한다. 예를 들면, 외과전문의들은 일반적으로 천연 조직-유사 느낌(예를 들면, 충분히 부드럽고, 유연하고, 및/또는 탄성을 가짐)을 갖는 재료들을 선호한다. 그리고, 이식 후, 조직 생성물이 보다 자연스럽게 느껴지도록 하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 유방확대에 사용된 조직들은 보다 자연스러운 느낌의 유방을 생성하도록 과도하게 뻣뻣하지 않아야 한다.

[0016] 그러나, 일부 조직 생성물들은 과도하게 뻣뻣할 수 있다. 예를 들면, 일부 외과전문의들은 STRATTICE™와 같은 돼지-유도된 진피 재료들이 ALLODERM®와 같은 인간-진피 생성물보다 덜 유연하다고 한다. 그러나, 상기 제품들의 느낌을 개선시키기 위한 방법들은 생성물의 생물학적 및/또는 기계적 특성들에 역효과를 가지지 않아야 한다. 특히, 생성물의 느낌을 개선시키기 위한 생성물의 처리는 인장강도와 같은 다른 기계적 특성들을 원치 않게 감소시키지 않아야 하며, 재료가 조직 재생 및/또는 복구를 지지하지 않는 방법으로 단백질 매트릭스를 변경하지 않아야 한다.

[0017] 본 발명의 상세한 설명은 조직들로부터 생성된 조직 생성물의 느낌을 개선시키기 위해 조직들을 처리하는 방법을 제공한다. 본 명세서는 또한, 상기 처리방법을 사용하여 제조된 조직 생성물도 제공한다. 그리고, 본 명세서는 조직들로부터 생성된 조직 생성물의 다공성을 조절하기 위해 조직들을 처리하는 방법을 제공한다. 일부 경우, 다공성을 조절하면, 세포 침투 및 조직 재생 및/또는 복구를 개선시킬 수 있다.

[0018] 따라서, 한 구체예에, 조직 매트릭스를 처리하는 방법이 설명되어 있다. 상기 방법은 콜라겐-함유 조직 매트릭스를 선택하는 단계 및, 조직 매트릭스 내 원하는 수준의 유연성을 생성하기에 충분한 조건하에, 상기 조직 매트릭스를 단백질분해 효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 구체예에, 조직 매트릭스를 처리하는 방법이 제공된다. 이 방법은 콜라겐-함유 무세포 조직 매트릭스를 선택하는 단계 및 조직 매트릭스 내 원하는 수준의 유연성을 생성하고 조직 매트릭스의 다공성을 증가시키기에 충분한 조건하에, 조직 매트릭스를 단백질분해 효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 방법들을 사용하여 효소에 의해 처리한 후의 무세포 조직 매트릭스(STRATTICE™) 뿐만 아니라 처리되지 않은 대조군을 보여준다. 도시된 바와 같이, 처리된 샘플들은 상당히 유연성이 높아졌다.

[0019] 여러 구체예에서, 단백질분해 효소에 의해 조직 매트릭스를 처리하면, 1가지 이상의 생물학적 특성들을 분해하지 않으면서 개선된 기계적 특성들이 개선된다. 예를 들면, 조직 매트릭스를 처리함으로써 염증 또는 상처형성을 증가시키지 않으면서, 및/또는 세포성장 및 재생을 촉진시킬 수 있는 조직 매트릭스의 능력을 감소시키지 않으면서 원하는 강성도, 느낌, 촉감 특성들 및/또는 원하는 다공성을 생성할 수 있다.

[0020] 조직은 다양한 다른 생물학적 및 기계적 특성들을 제공하도록 선택될 수 있다. 예를 들면, 무세포 조직 매트릭스 또는 다른 조직 생성물은, 조직 성장 및 리모델링이 매트릭스가 이식된 부위에서 보통 발견되는 조직의 재생을 돕도록, 선택될 수 있다. 예를 들면, 근막 위에 또는 근막 안으로 이식될 때 무세포 조직 매트릭스는, 과도한 섬유 형성 또는 상처 형성없이 근막을 재생시키기도록 선택될 수 있다. 특정 구체예에서, 조직 생성물은 ALLODERM® 또는 STRATTICE™로부터 형성될 수 있으며, 이는 각각 인간 및 돼지 무세포 진피 매트릭스이다. 대안적으로, 이하에 추가로 설명되는 바와 같이, 다른 적당한 무세포 조직 매트릭스가 사용될 수 있다. 조직은 피부(진피 또는 전체 피부), 근막, 심막 조직, 경뇌막, 탯줄 조직, 태반 조직, 심장판막 조직, 인대 조직, 힘줄조직, 동맥 조직, 정맥 조직, 신경연결 조직, 방광 조직, 요관 조직 및 창자 조직을 포함하는 다양한 조직 공급원들로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 방법들은 임의의 콜라겐 조직 타입 및 임의의 조직 매트릭스 생성물을 처리하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 다수의 생물학적 비계 물질들은 Badylak et al.에 설명되어 있으며, 본 발명의 방법들은 당 분야에 공지된 상기 조직 생성물 또는 다른 조직 생성물들을 처리하기 위해 사용될 수 있다. Badylak et al., "Extracellular Matrix as a Biological Scaffold Material: Structure and

Function," Acta Biomaterialia (2008), doi:10.1016/j.actbio.2008.09.013.

[0021] 일부 경우, 조직 매트릭스가 무세포화된 조직 매트릭스로서 제공될 수 있다. 적당한 무세포 조직 매트릭스는 이하에 추가로 설명된다. 다른 경우, 상기 방법은 세포들 또는 다른 물질들을 제거하기 위해 온전한 조직을 처리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 조직들은 완전히 또는 부분적으로 무세포화되어, 환자들에게 사용될 수 있는 무세포 조직 매트릭스 또는 세포외 조직 물질들을 생성할 수 있다. 예를 들면, 피부, 창자, 뼈, 연골, 신경조직(예를 들면, 신경섬유 또는 경뇌막), 힘줄, 인대 또는 다른 조직들과 같은 다양한 조직들이 완전히 또는 부분적으로 무세포화되어 환자에게 유용한 조직 생성물들을 생성할 수 있다. 일부 경우, 이러한 무세포화 생성물들은 외인성 세포 물질들(예를 들면, 줄기세포)의 첨가없이 사용될 수 있다. 특정 경우, 이러한 무세포화된 생성물들은 처리를 용이하게 하기 위해, 자가 공급원 또는 다른 공급원으로부터의 세포들이 심어질 수 있다. 무세포 조직 매트릭스를 제조하기 위한 적당한 방법들은 이하에 설명되어 있다.

[0022] 조직 매트릭스를 처리하기 위해 다수의 다른 효소들이 사용될 수 있다. 예를 들면, 적당한 효소들은 브로멜라인과 같은 설프하이드릴 프로테아제를 포함할 수 있다. 그리고, 이들은 브로멜라인, 파파인, 피신, 악티니딘 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 효소들은 상업용으로 구입하거나, 또는 과일 공급원으로부터 추출될 수 있다. 예를 들면, 브로멜라인의 한 공급원은 맥코믹 연육제(MCCORMICK MEAT TENDERIZER®)이지만, 효소들은 파인애플에서 추출될 수도 있으며/있거나, 의료급 제제로 구입될 수도 있다.

[0023] 다른 기계적 및/또는 생물학적 특성들을 원치 않게 분해하지 않으면서, 조직의 유연성을 증가시키기 위해 효소들이 조직들과 접촉될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 개시된 효소처리와 함께 또는 효소처리 없이 재료들의 배치(batch)가 제조될 때, 효소처리는 인장강도, 인열강도, 봉합강도, 크리프내성, 콜라게나제 민감도, 글리코스아미노글리칸 함량, 렉틴 함량, 파괴강도, 열전이온도, 또는 이들의 조합들 중 적어도 하나에 있어서 원치 않은 변화를 일으키지 않을 것이다. 일부 경우, 원치않는 변화는 인장강도, 인열강도, 봉합강도, 크리프내성, 글리코스아미노글리칸 함량, 렉틴 함량, 파괴강도 중 어느 하나의 통계적으로 유의한 감소; 콜라게나제 민감도의 증가; 또는 (시차주사 열량계를 사용한 측정으로서) 열전이온도의 변화(상향 또는 하향)이다.

[0024] 위에 설명한 바와 같이, 일부 구체예에서, 조직들은 조직의 다공성을 증가시키기 위해 효소에 의해 처리된다. 다양한 구체예에서, 채널들의 수 및/또는 크기를 증가시키기 위해 조직의 다공성을 증가시키며, 이는 세포침투 및 조직재생의 속도를 개선시킬 수 있다.

[0025] 일부 경우, 조직내에서 단백질들을 부위-특이적으로 제거하도록 효소가 선택된다. 예를 들면, 브로멜라인에 의해 돼지 진피물질을 처리하면, 특정량의 처리후 매트릭스 구조가 추가로 변형되지 않음을 발견하였다. 그러므로, 브로멜라인에 의해 진피를 처리하면, 연장된 노출에 의해, 또는 연장된 시간 이후 매트릭스가 추가로 변경되지 않는다.

[0026] 그리고, 다양한 적당한 용액내 조직에 효소를 적용할 수 있다. 예를 들면, 브로멜라인은 정상 식염수로 조직에 적용될 때 효과적인 것으로 밝혀졌지만, 다른 적당한 버퍼들(예를 들면, PBS)이 사용될 수 있다.

[0028] **무세포 조직 매트릭스**

[0029] 본 명세서에 사용된, "무세포 조직 매트릭스"라는 용어는 일반적으로, 세포 및/또는 세포성분들이 실질적으로 없는 조직 매트릭스를 의미한다. 피부, 피부의 일부(예를 들면, 진피) 및 다른 조직들, 예를 들면 혈관, 심장판막, 근막, 연골, 뼈 및 신경연결조직이 본 발명의 범주내에서 무세포 매트릭스를 형성하기 위해 사용될 수 있다. 무세포 조직 매트릭스는 많은 방식으로 이들이 세포 및/또는 세포성분들이 실질적으로 없는 지를 측정하기 위해 시험 또는 평가될 수 있다. 예를 들면, 세포들(살아있는 세포 또는 죽은 세포) 및/또는 세포성분들이 남아있는지를 측정하기 위해, 처리된 조직들을 광학 현미경으로 조사할 수 있다. 그리고, 세포 또는 세포성분들의 존재를 확인하기 위해 특정 분석법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 조직 매트릭스 내 남은 핵물질들을 정량화하기 위해, DNA 또는 다른 핵산분석법들을 사용할 수 있다. 일반적으로, 남은 DNA 또는 다른 핵산들의 부재는 완전한 무세포화(즉, 세포 및/또는 세포성분들의 제거)의 지표가 될 것이다. 마지막으로, 조직 매트릭스가 무세포인지를 측정하기 위해, 세포-특이적 성분들(예를 들면, 표면항원)을 확인하는 다른 분석법들이 사용될 수 있다. 피부, 피부의 일부(예를 들면, 진피) 및 다른 조직들, 예를 들면 혈관, 심장판막, 근막, 연골, 뼈 및 신경연결조직이 본 발명의 범주내에서 무세포 매트릭스를 형성하기 위해 사용될 수 있다.

[0030] 일반적으로, 무세포 조직 매트릭스를 제조하는데 포함되는 단계들은 도너(예를 들면, 인간 시체 또는 동물 공급원)로부터 조직을 채취하는 단계 및 생물학적 및 구조적 기능을 보존하는 조건하에 세포를 제거하는 단계를 포

함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 세포제거와 함께 또는 세포제거 전에, 조직을 안정화하고, 생화학적 및 구조적 분해를 피하기 위한 화학적 처리단계를 포함한다. 다양한 구체예에서, 안정화 용액은 삼투분해, 저산소분해, 자가분해 및 단백질분해를 정지시키고 막으며, 세균오염에 대하여 보호하고, 예를 들면, 평활근 성분들(예를 들면, 혈관)을 함유하는 조직들에 의해 일어날 수 있는 기계적인 손상을 감소시킨다. 안정화용액은 적당한 버퍼, 1종 이상의 산화방지제, 1종 이상의 종양제제, 1종 이상의 항생제, 1종 이상의 프로테아제 억제제, 및/또는 1종 이상의 평활근 이완제들을 함유할 수 있다.

[0031] 그후, 조직을 무세포화 용액에 넣어, 콜라겐 매트릭스의 생물학적 및 구조적 무결성을 손상시키지 않으면서 구조적 매트릭스로부터 실시가능한 세포들(예를 들면, 상피세포, 내피세포, 평활근세포 및 섬유아세포)을 제거한다. 무세포화 용액은 적당한 버퍼, 염, 항생제, 1종 이상의 세제(예를 들면, TRITON X-100™, 소듐 데옥시콜레이트, 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노-올레이트), 1종 이상의 가교방지제, 1종 이상의 억제제 및/또는 1종 이상의 효소들을 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 무세포화 용액은 젠타마이신 및 25mM EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산)와 함께 RPMI 매질내에 1% TRITON X-100™을 포함한다. 일부 구체예에서는, 조직을 무세포화 용액 내에서 90rpm로 약하게 셰이킹하면서 37℃에서 밤새 배양하였다. 특정 구체예에서는, 조직 샘플로부터 지방을 제거하기 위해, 추가의 세제들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 일부 구체예에서 2% 소듐 데옥시콜레이트를 무세포화 용액에 첨가한다.

[0032] 무세포화 과정이후에, 조직 샘플을 식염수로 철저하게 세척한다. 일부 예시 구체예에서, 예를 들면 이종발생성 재료가 사용되는 경우, 그후 무세포화 조직을 실온에서 데옥시리보뉴클레아제(DNase) 용액에 의해 밤새 처리한다. 일부 구체예에서, DNase 버퍼(20mM HEPES(4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에테인설폰산), 20mM $CaCl_2$ 및 20mM $MgCl_2$)내에서 제조한 DNase 용액에 의해 조직 샘플을 처리한다. 대안적으로, 항생용액(예를 들면, 젠타마이신)을 DNase 용액에 첨가할 수 있다. 버퍼가 적당한 DNase 활성을 제공하는 한 임의의 적당한 버퍼이면 어느 버퍼나 사용될 수 있다.

[0033] 무세포 조직 매트릭스가 무세포 조직 매트릭스 이식의 수용체와 동일한 종의 한 개 이상의 개체로부터 제조될 수 있는 반면, 반드시 꼭 그런 것은 아니다. 따라서, 예를 들면 무세포 조직 매트릭스는 돼지조직으로 제조되어, 사람 환자에 이식될 수 있다. 무세포 조직 매트릭스의 수용체 및, 무세포 조직 매트릭스를 제조하기 위한 조직 또는 기관들의 도너로서 제공할 수 있는 종(species)들은 제한 없이, 포유동물, 예를 들면 인간, 비인간 영장류(예를 들면, 원숭이, 비비 또는 침팬지), 돼지, 암소, 말, 염소, 양, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 게르빌루스쥐, 햄스터, 쥐 또는 마우스를 포함한다.

[0034] 콜라겐-함유 재료로부터 α-gal 에피토프를 제거하면, 콜라겐-함유 재료에 대한 면역반응을 감소시킬 수 있다. α-gal 에피토프는 비-영장류 포유동물에서 및 신세계 광비원류(남아프리카 원숭이)뿐만 아니라 거대분자들, 예를 들면 세포외 성분들의 프로테오글리칸에서 발현된다. U. Galili et al., J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). 그러나, 이 에피토프는 구세계 영장류(아시아 및 아프리카의 원숭이 및 유인원) 및 인간에게는 부재한다. Id. 항-gal 항체들은 위장 세균상에서 α-gal 에피토프 탄수화물 구조체에 대한 면역반응의 결과로서 인간 및 영장류에서 생성된다. U. Galili et al., Infect. Immun. 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh et al., J. Clin. Invest. 89: 1223 (1992).

[0035] 비-영장류 포유동물(예를 들면, 돼지)은 α-gal 에피토프를 생성하므로, 상기 포유동물로부터 영장류로 콜라겐-함유 재료를 이종기관이식하면, 콜라겐-함유 재료 상의 상기 에피토프들에 대한 영장류 항-Gal 결합 때문에 거부반응이 종종 일어난다. 상기 결합은 보완고정(complement fixation) 및 항체의존성 세포독성에 의해, 콜라겐-함유 재료를 파괴시킨다. U. Galili et al., Immunology Today 14: 480 (1993); M. Sandrin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11391 (1993); H. Good et al., Transplant. Proc. 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., J. Immunol. 154: 5500 (1995). 그리고, 이종기관이식은 증가된 양의 고친화도 항-gal 항체들을 생성시키기 위해 면역시스템을 주로 활성화시킨다. 따라서, 일부 구체예에서, α-gal 에피토프를 생성하는 동물이 조직 공급원으로 사용될 때, 콜라겐-함유 재료의 세포외 성분들 및 세포들로부터 α-gal 에피토프를 실질적으로 제거하고, 세포성 α-gal 에피토프를 재발현하는 것을 막으면, α-gal 에피토프에 대한 항-gal 항체결합과 관련된 콜라겐-함유 재료에 대한 면역반응을 감소시킬 수 있다.

[0036] α-gal 에피토프를 제거하기 위해, 식염수로 조직을 철저히 세척하여 DNase 용액을 제거한후, 조직 샘플을 1회 또는 그 이상 효소처리하여, 특정의 면역원 항원이 샘플내에 존재한다면 이를 제거할 수 있다. 일부 구체예에서, α-gal 에피토프가 조직내에 존재한다면 이를 제거하기 위해, 조직 샘플을 α-갈락토시다제 효소로 처리할 수 있다. 일부 구체예에서, pH 6.0의 100mM 인산염 버퍼에서 제조된 300U/L의 농도로 α-갈락토시다제로

조직 샘플을 처리한다. 다른 구체예에서, 채취된 조직으로부터 α-gal 에피토프를 적당하게 제거하기 위해, α-갈락토시다제의 농도를 400U/L로 증가시킨다. 항원이 충분히 제거되는 동안 임의의 적당한 효소 농도 및 버퍼가 사용될 수 있다.

[0037] 대안적으로, 상기 조직을 효소들로 처리하는 것 보다는, 1개 또는 그 이상의 항원성 에피토프가 누락되도록 유전적으로 변형된 동물들을 조직 공급원으로 선택할 수 있다. 예를 들면, 말단 α-갈락토스 성분을 누락하도록 유전적으로 조작된 동물(예를 들면, 돼지)을 조직 공급원으로 선택할 수 있다. 적당한 동물들에 대한 설명을 위해, 동시계류중인 미국 특허출원 시리얼번호 제10/896,594호 및 미국특허 제6,166,288호를 참고하며, 이들은 이후에 참고문헌으로 전문 통합된다. 그리고, α-1,3-갈락토스 성분들의 양을 감소시키거나 또는 누락시킴에 의해, 또는 없이, 무세포 매트릭스를 제조하기 위한 조직들의 특정 처리방법들은 Xu, Hui. et al., "A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold that Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose-α-(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure," Tissue Engineering, Vol. 15, 1-13 (2009)에 설명되어 있으며, 이는 이후에 참고문헌으로 전문 통합된다.

[0038] 무세포 조직 매트릭스가 형성된 후, 조직적합성 실행가능한 세포들을 무세포 조직 매트릭스에 선택적으로 심어서, 숙주에 의해 추가로 재모델링될 수 있는 이식을 형성한다. 일부 구체예에서, 조직적합성 실행가능한 세포들은 이식하기 전에 표준 시험관내 세포 동시-배양기술에 의해, 또는 이식한후 생체내 재증식에 의해 매트릭스에 첨가될 수 있다. 생체내 재증식은 수용체 자체의 세포들이 무세포 조직 매트릭스로 이동함으로써, 또는 수용체로부터 얻은 세포들 또는 다른 도너로부터의 조직적합성 세포들을 무세포 조직 매트릭스로 원 위치에 주입 또는 주사함으로써 이루어질 수 있다. 배아줄기세포, 성인줄기세포(예를 들면, 간엽줄기세포) 및/또는 신경세포를 포함하는 다양한 세포타입들이 사용될 수 있다. 다양한 구체예에서, 이식하기 직전 또는 이식한 직후, 세포들을 무세포 조직 매트릭스의 내부에 직접 적용할 수 있다. 특정 구체예에서, 이식되는 무세포 조직 매트릭스 내에 세포들을 넣을 수 있으며, 이식하기 전에 배양할 수 있다.

[0040] **실시예**

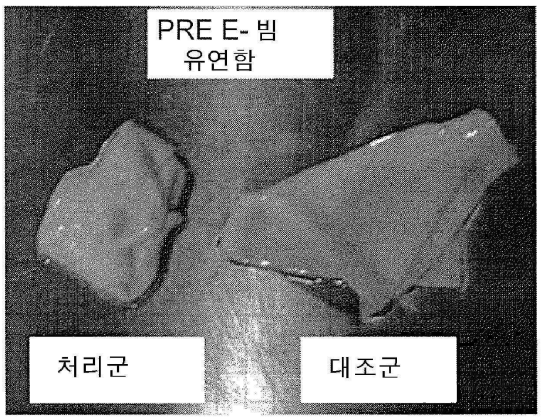
[0041] 본 실시예는 돼지 진피 무세포 조직 매트릭스를 브로멜라인으로 처리하여, 재료의 유연성을 증가시키는 방법을 설명하고 있다. 이하에 설명되는 바와 같이, 이렇게 처리함으로써, 다양한 기계적 특성들의 바람직하지 않은 변형을 야기하지 않았다. 그리고, 본 처리는 재료의 다공성을 증가시키고, 세포침투 및 조직재생의 속도를 개선시킬 수 있다.

[0042] 본 실험을 위해, LIFECELL CORPORATION (Branchburg, NJ) 제 STRATTICE™ 무세포 조직 매트릭스를 사용했다. STRATTICE™는 재료가 얻어지는 해부학적 위치에 따라, 유연성 형태 및 보다 견고한 버전으로 사용가능하다. 본 실험에는 두 타입 모두 사용하였다. 실험에 사용한 샘플들을 4등분하여 자르고, 그 중 3부분들을 처리하였다. 처리하지 않은 샘플(1부분)을 대조군으로 사용하고; 대조군은 처리하는 동안에는 냉장보관하였다. STRATTICE™를 용액내에 패키징하고, 따라서 재수화를 필요로 하지 않는다. 맥코믹 연육제 55g을 함유하는 차가운 수돗물 0.5리터에 상기 처리된 샘플들을 넣었다.

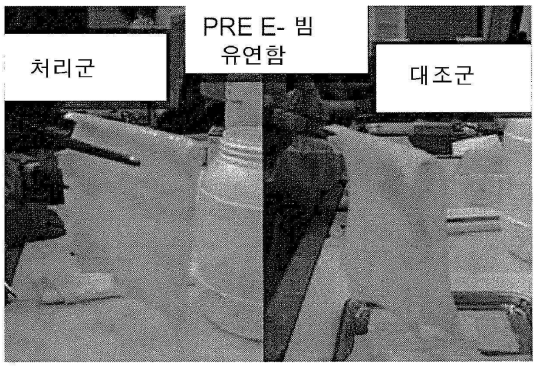
[0043] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 방법을 사용하여 효소처리된 후의 무세포 조직 매트릭스뿐만 아니라 처리되지않은 대조군들을 나타낸다. 도 2 내지 6은 각 처리된 샘플들 및 대조군 샘플들의 인장강도, 봉합강도, 인열강도, 엘라스타제 분해 및 크리프내성의 박스 플롯이다. 처리된 샘플들을 대조군들과 비교할 때, 유연성이 두드러지게 증가하였지만 다른 기계적 특성들은 크게 감소되지 않았다. 그리고, 열전이온도 또는 콜라게나제 민감도에 있어서는 큰 변화가 발견되지 않았다. 전체 짝지어진 T-시험은 대조군과 처리군 사이에 통계적으로 차이가 없음을 보여주었다.

도면

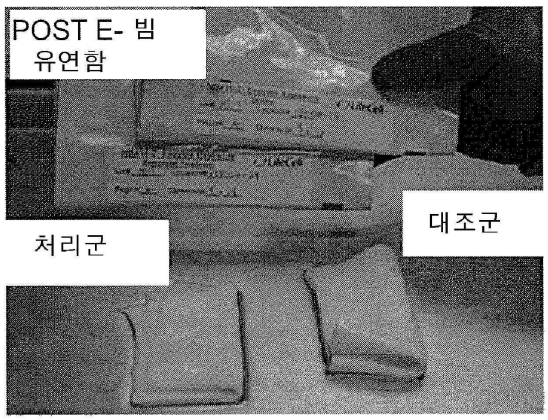
도면1a



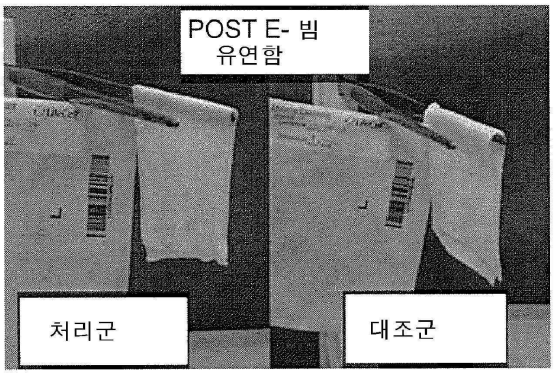
도면1b



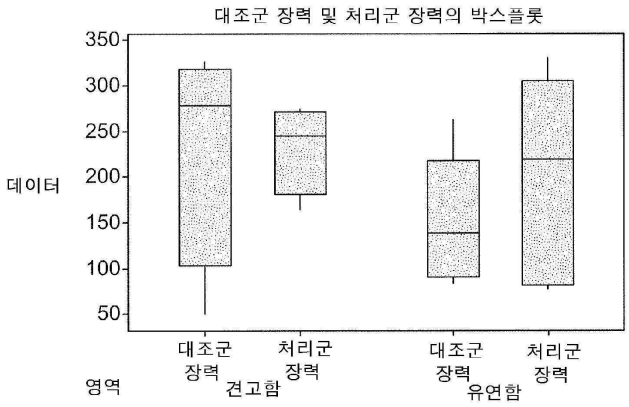
도면1c



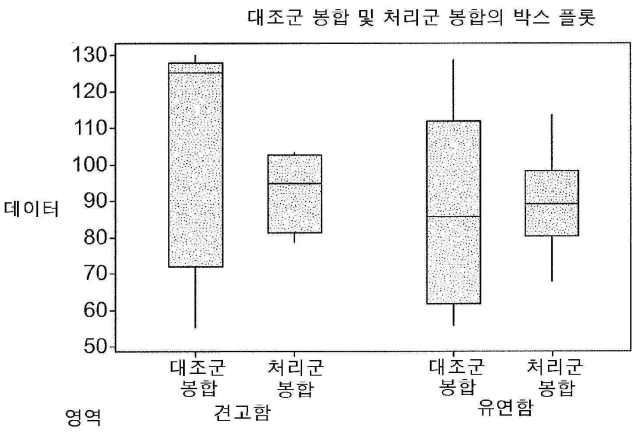
도면1d


POST E- 빔
유연함
처리군
대조군

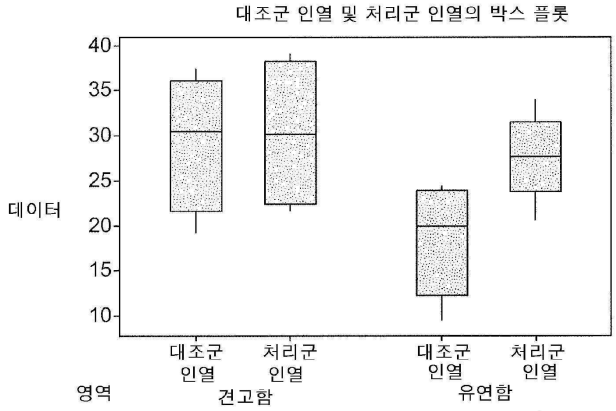
도면2


대조군 장력 및 처리군 장력의 박스플롯
데이터
350
300
250
200
150
100
50
대조군 장력
처리군 장력
대조군 장력
처리군 장력
영역
견고함
유연함

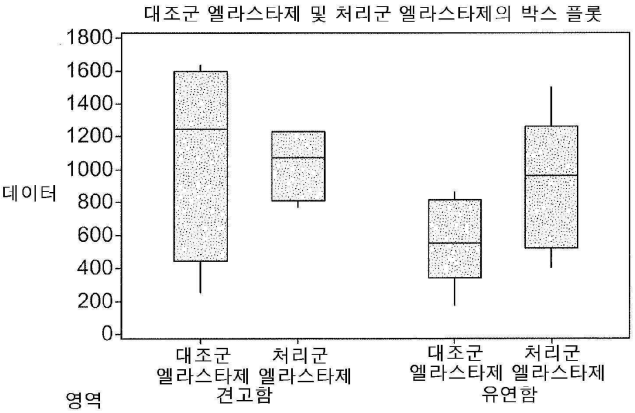
도면3


대조군 봉합 및 처리군 봉합의 박스 플롯
데이터
130
120
110
100
90
80
70
60
50
대조군 봉합
처리군 봉합
대조군 봉합
처리군 봉합
영역
견고함
유연함

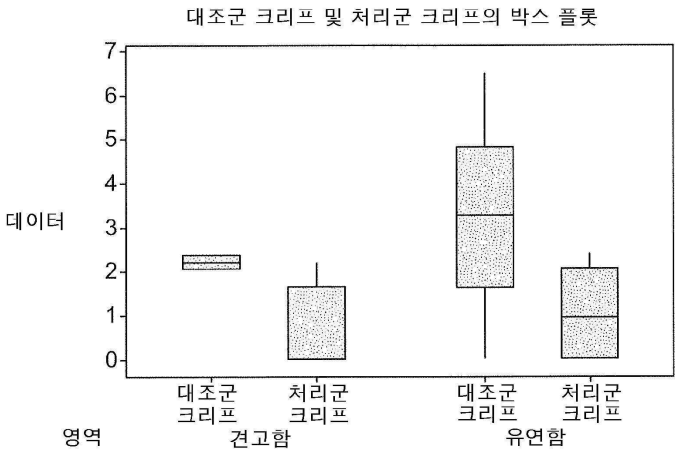
도면4


대조군 인열 및 처리군 인열의 박스 플롯
데이터
40
35
30
25
20
15
10
대조군 인열
처리군 인열
대조군 인열
처리군 인열
영역
견고함
유연함

도면5


대조군 엘라스타제 및 처리군 엘라스타제의 박스 플롯
데이터
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
대조군 엘라스타제
처리군 엘라스타제
대조군 엘라스타제
처리군 엘라스타제
영역
견고함
유연함

도면6


대조군 크리프 및 처리군 크리프의 박스 플롯
데이터
7
6
5
4
3
2
1
0
대조군 크리프
처리군 크리프
대조군 크리프
처리군 크리프
영역
견고함
유연함