(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.[6]
A61F 2/02
A61F 2/08

(45) 공고일자 2005년04월20일
(11) 등록번호 10-0417896
(24) 등록일자 2004년01월28일

(21) 출원번호 10-1998-0700653
(22) 출원일자 1998년01월30일
번역문 제출일자 1998년01월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US1996/011272
국제출원일자 1996년07월03일
(65) 공개번호 10-1999-0035989
(43) 공개일자 1999년05월25일
(87) 국제공개번호 WO 1997/04720
국제공개일자 1997년02월13일

(81) 지정국

국내특허 : 아일랜드, 알바니아, 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 체코, 에스토니아, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 라이베리아, 리투아니아, 라트비아,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 레소토,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄,

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

(30) 우선권주장 08/508,773 1995년07월28일 미국(US)

(73) 특허권자
이소라겐 테크놀리지스, 인코퍼레이션
미국, 텍사스 77042, 휴스톤, 슈이트 540, 윌크레스트 2500

(72) 발명자
보스, 윌리암, 케이., 쥬니어.
미국, 뉴저지 07009 세다르 그루브, 크레스몬트 로드 349

(74) 대리인
강석용
강명구

심사관 : 이정희

(54) 피부와연조직결함을복구하기위한자가진피섬유아세포

요약

개체에 피하 또는 진피 조직을 복구하는 방법에 관계한다. 방법은 개체로부터 수득한 견본으로부터 배양된 진피 섬유아세포를 준비하고 면역원성 단백질이 없는 섬유아세포 준비물을 주사하여 피하 또는 진피 조직을 복구하는 것과 연관된다. 방법은 추피, 연장 마크, 눌린 반흔 그리고 외상이 원인이 아닌 피하 눌림 및 미용상 입술 증식 등에 이용될 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 사람에게서 주름을 포함하는 피부와 연조직 결함을 복구하는 것에 관계한다. 좀더 구체적으로는 진피의 용적 또는 피하 조직의 용적을 증가시키는 비-외과적인 기술에서 사용할 수 있는 신규 물질에 관계한다. 자가 세포 현탁액을 주입함으로써, 본 발명은 현행 이용되는 물질에 수반되는 단점 없이 인접 조직의 장기간 증식을 제공할 수 있다.

배경기술

미적인 효과를 얻기 위해 신체 특히 얼굴에 물질을 주입("주입물")하게 된 것은 19세기말이었다. 예를 들면, 세계 1차 대전 이전에 수년간 안면 윤곽 결점을 교정하기 위해 파라핀을 주입하게 되었다. 그러나, 장기간 병발증과 만족스럽지 못한 성질로 인하여 그 실행이 포기되게 되었다. 주사 가능한 실리콘은 1960년 초기에 시작된 이와 같은 사건이 실제 반복되게 되었다. 특별히 제조된 "의료용 등급" 실리콘 용액 예를 들면 Dow Corning MDX4.4011은 미합중국에서 승인된 다수의 테스트 기관에서 실험용으로 사용되어왔다. 실리콘에 대한 국소 또는 전신 반응과 같은 발병증, 주입물의 이주 및 국소 조직의 붕괴 등으로 실리콘 주사의 이용이 제한되어왔다. 실리콘 주사액의 고유 성분은 제한된 수의 개체에서 이들 실험 프로그램에 계속 이용되어 왔으나 외과의사나 치료사에의해 이와 같은 기술이 채택될 것으로는 보이지 않는다(Reviewed in Matton, G., et al., 1985. Aestheic Plastic Surgery 9:133-40; Spira, M. & Rosen, T., 1993, Clin. Plastic Surgery 20:181-9).

비-생물학적 물질의 주사에 의해 얻어지는 나쁜 결과는 외부 단백질, 특히 주입물로써 소 콜라겐을 이용하는 시도가 촉진되었다. 처리 안된 소 콜라겐은 사람에게 주입하기에는 적합하지 않은 면역원이지만 소 콜라겐의 C- 및 N-단부 펩티드를 효소 분해에 의해 절단하면 아텔로콜라겐(atelocollagen)이 만들어지는데 이는 면역 반응을 가지는 환자를 배제하기 위해 환자를 선별한다면 제한된 양으로 이용될 수 있다. 이와 같은 생성물을 준비하고 이용하는 방법은 미국 특허 3,949,073; 4,424,208; 4,488,911에 상술하고 있다. 생성물은 35㎎/㎖ 와 65㎎/㎖농도로 용액에 아텔로콜라겐(atelocollagen)을 ZYDERM^{R}로 시판하고 있다. 미합중국에서만 1987년에 200,000명 이상이 사용하는 것과 같이 전세계적으로 이용되고 있으나, ZYDERM을 이용하면 개체의 약 90%에서 항-소 항체가 발생하게 되고 개체의 약 1-3%가 공공연한 면역학적 복합증이 있는 것으로 나타난다(Delustro, F. et al., 1987. Plastic and Reconstructive Surgery 79:581).

아텔로콜라겐 용액은 주입 부위로부터 개체에 의해 수주 내지 몇 달에 걸쳐 물질의 대체 없이 흡수되기 때문에 완벽한 만족을 제공하지는 못하는 것으로 증명되었다. 반복된 주입으로 구성된 프로토콜을 고려중이지만 이와 같은 프로그램은 실제 소의 아텔로콜라겐에대한 면역 반응의 개발, 비용 및 환자의 저항성등에의해 제한을 받게된다. 이와 같은 제한을 극복하기 위해 소 아텔로콜라겐은 글루타알데히드 교차-연결, 여과, 미세한 메쉬를 통과시켜 전단시키는 등에 의한 처리받게 된다. 이와 같은 물질의 생산 및 이용은 미국 특허 4,582,640; 4,642,117 등에 상술되어 있다. 따라서 생산된 생성물은 교차 연결된 아텔로콜라겐을 ZYPLAST^{R} 상표로 시판되었다. 점성을 증가시킴으로써 숙주 분해에 대해 저항성을 증가시키는 것이 교차-연결된 장점이다. 증가된 점성 특히, 불규칙적인 점성("Lumpiness")은 물질을 사용하기 어렵게 만들고 특정 목적에는 사용할 수 없게 된다(See. e.g.,미국 특허 5,366,498).

또한, 일부 연구자들은 ZYDERM과 비교할 때 ZYPLAST의 지속성은 증가되지 않았거나 약간 증가되었을 뿐이고 주입 효과 기간도 약 4 내지 6개월인 것으로 보고하고 있다(Matti, B.A. & Nicolle, F.V., 1990, Asthetic Plastic Surgery 14:227-34; Ozgentas, H.E. et al., 1994, Ann Plastic Surgery 33:171). 대부분의 연구자들의 경험으로는 약 4 내지 6주 후에 눈에 띄는 흡수가 있었다.

사람에서 소 콜라겐의 면역원성에의해 부가되는 제한은 태반으로부터 사람 콜라겐(미국 특허 5,002,071); 및 외과용 견본(미국 특허 4,969,912; 미국 특허 5,332,802)을 준비하는 것을 고려하게 되었다. 또한 가교결합 및 다른 화학적 변형에 의한 사람 콜라겐의 처리가 요구되는데 그 이유는 사람 콜라겐이 소 콜라겐과 같이 동일한 분해과정을 겪게되기 때문이다.

개체 고유 조직 샘플로부터 완전하게 유도된 주사용 사람 콜라겐을 이용할 수 있고 이는 AUTOLOGEN^{TM} 상표로 시판하고 있다. 사람 콜라겐 주입이 소 콜라겐 주입보다도 더 지속적인 효과를 가진다는 증거는 없다. 또한 자가 처리된 콜라겐을 이용은 안면-양력(lift) 과정을 겪는 개체에 한정되는데 그 이유는 이의 생선을 위한 출발 물질이 이와 같은 수술동안에 제거되는 피부이기 때문이다. 분명한 것은 자가 처리된 콜라겐은 소 콜라겐의 면역원성을 극복할 수 있으나 소 콜라겐과 같이, 장기간 치료요법적 효과를 제공하지는 못하고 외과술을 겪은 환자에게만 국한된다.

또는 젤라틴 분말, ε-아미노카프로닌 산과 인접한 진피를 증식시키기 위한 목적으로 아텔로콜라겐의 대용품으로 이용되는 개체의 혈장("FIBREL") 혼합물을 주사하였다(Multicenter trial, 1987, J. Am. Acad. Dermatol.16:1155-62).

FIBREL^{TM}의 작용은 연조직을 증강시키기위해 경화증, 염증 반응을 유도하는데 일부 의존하는 것으로 보인다(Gold, M.H., 1994, J. Dermatologic Surg. Oncol. 20:586-90). 비록 FIBREL^{TM} 치료에 대한 보고서에서는 환자를 분류하는 장점은 있으나(Millikan, L., et al., 1991, J. Dermatologic Surg. Oncol. 17:223-29), 울퉁불퉁해지거나 지속성이 부족한 결과를 가져오게 된다. FIBREL^{TM}을 이용은 주사와 연관된 불편함으로 제한을 받고 의사들은 이를 준비하는데 상당히 지루한 작업이기 때문이다.

요약하면, 진피와 연조직을 증강시키기 위한 목적으로 완전히 만족시킬만한 살아있지 않은 이용 가능한 주사용 물질은 없다.

FIBREL^{TM}을 이용하는데 문제점과 아텔로콜라겐 주사물로 인한 장기간 지속되는 결과를 얻을 수 없는 것으로 인하여 진피와 연조직을 증강시키기위한 살아있는 지방 조직 이식편을 수득하기 위한 일부 시도를 촉진시켰다. 지방 조직을 외과적으로 제공하고 다시 이식할 때 주요 단점을 교정하는데 좋은 결과를 얻을 수 있다(McKinney, P. & Pandya, S., 1994 Aestheic Plastic Surgery 18:383-5; Davies, R.E. et al., 1995 Arch of Otolaryngology-Head & Neck Surgery 121:95-100). 그러나, 주사에 의해 이식편을 대체시켜야 하는 복구를 위해서는 결과는 다소 만족스러운 결과를 얻을 수는 없었다(Ersek, R.A., 1991, Plastic & Reconstructive Surgery 87:219-27). 따라서, 일부 만족스러운 결과가 보고되기는 하였으나(예로써, Hambley, R.M. & Carruthers, J.A., 1992, J. Derm. Surgery & Oncol. 18:963-8) 이와 같은 방법의 제안서는 만족스러운 결과를 가져오지 못한 대부분의 연구자들에게 승인을 받았다(Lewis, C.M., 1993, Aesthetic Plastic Surgery 17:109-12). 의사나 연구가들 사이에서 부딪히는 문제점가운데에는 예측부가와 울퉁불퉁해지는 결과인데 이는 작은 주름을 치료하는데에는 적합하지 않고 주사후 팽창되는 기간은 최장 4-6주간 지속된다.

발명의 요약

본 발명은 결함이 있는 진피 및 피하 조직 내로 자가 진피 섬유아세포 현탁액을 주사하여 개체의 피부에 미적인 단점을 교정하는 방법에 관계한다. 이와 같은 방법에 의해 교정될 수 있는 일반적인 결함에는 주름제거, 신장 마크, 눌려진 반흔, 외상이 없는 피하 눌린 자국, 심상성 좌창(acne vulgaris)로 인한 반흔, 입술의 감형성 등을 포함한다. 본 발명에 따라 주입된 세포는 개체에 조직적합성을 가지고 이들은 세포 계대 시스템에의해 계대하여 연장될 수 있는 세포이다. 적절한 구체예에서, 이식된 세포는 진피 섬유아세포이고 이는 개체로부터 취한 생검 견본 배양물로부터 유도된 것이다.

본 발명은 또한 피부에서 결함을 교정하는데 이용하기 위해 배양 배지에 있는 면역원성 단백질이 없는 계대된 진피 섬유아세포를 제공하는 방법을 제공하는 것이다. 이 방법은 단백질이 없는 배지에서 일정 시간동안에 연장된 섬유아세포를 배양하는 것으로 구성된다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 결함이 있는 진피 또는 피하 조직을 증강시키는 이상적인 물질이 진피에 통상적으로 존재하는 조직 형태의 살아있는 세포라는 것을 인식한 것에 기초한다. 또한 본 발명은 주사하기 전에 몇 주간 개체로부터 취한 생검 견본을 배양함으로써 원하는 형체의 자가 세포를 풍부하게 공급할 수 있다는 인식에 기초한다. 또한 본 발명은 이와 같은 조직 배양 연장 후에 자가 세포에는 상당량의 항원성 단백질을 포함할 수 있으나 주사하기 전에 이와 같은 항원성 단백질을 본 출원의 방법에 따라 제거하는 것을 인식한 것에 기초한다.

실시예

4.1. 주사용 세포 현탁액을 얻는 방법

본 발명은 배양물에서 연장할 수 있는 임의 미분화된 간엽세포(mesenchymal cell)를 주사하여 실행한다. 적절한 구체예에서는 진피 섬유아세포를 주사하는데 그 이유는 이들은 용이하게 수득하고 연장할 수 있고 또한 진피 및 인접 조직에 일반적으로 존재하는 세포중의 하나이기 때문이다.

진피 섬유아세포 배양은 피부의 2×5㎜ 전체 두께 생검 견본으로부터 시작한다. 이식 외과의사나 면역학자에게 공지인 타가 이식 거부반응 현상 때문에 배양된 섬유아세포는 숙주와 조직적합성을 가지는 것이 필수이다. 조직적합성은 진피 교정을 해야하는 개체로부터 생검으로부터 수득하여 이와 같은 견본으로부터 섬유아세포를 배양하여 확인할 수 있다.

배양을 개시하기 전에 생검물을 항생제 및 항-곰팡이제를 이용하여 반복적으로 세척한다. 그 다음, 상피와 피하 지방세포를 포함하는 조직을 제거하고 생성된 배양물에는 섬유아세포 세포가 아닌 세포는 없고 진피의 견본은 칼이나 가위로 미세하게 분할한다. 견본 조각은 조직 배양 플라스크의 건조 표면위에 개별적으로 핀셋을 이용하여 배치시키고 5 내지 10분간 흡착을 허용하고 소량의 배지를 첨가하는데 이때 흡착된 조직 단편이 떨어지지 않도록 주의한다. 배양 24시간 후에 플라스크에는 추가 배지를 공급한다. T-25 플라스크를 이용하여 배양을 개시하는데 초기 배지의 양은 1.5 내지 2.0㎖이다. 생검 견본으로부터 세포주의 성립은 연장을 위해 초기 배양 용기로부터 세포를 제거한 시점에서 약 2 내지 3주 소요된다.

배양 초기단계에서는 조직 단편은 배양 용기 바닥에 흡착된 채로 남아있고 떨어진 단편은 새로운 용기에 다시 이식한다. 섬유아세포는 본 기술에 공지인 기술을 이용하여 EDTA-트립신에 조직 배양물을 간단히 노출시켜 만들 수 있다. 트립신에 노출은 간단하게 하여 배양 용기 벽에 부착된 섬유아세포가 방출되지 않는다. 배양물이 만들어지고 합류하는 즉시 섬유아세포 샘플은 냉동 저장을 위해 빼낸다. 후기 계대 섬유아세포보다는 초기 냉동 저장이 적절한데 그 이유는 정상적인 사람 섬유아세포에서는 계대의 수가 제한을 받기 때문이다.

섬유아세포는 섬유아세포를 보존하기에 적합한 임의 냉동 배지에서 냉동한다. 우수한 효과를 가지는 70% 성장 배지, 20%(v/v) 태아 송아지 혈청 및 10%(v/v) 디메틸설폭시드(DMSO)로 구성된 배지를 이용할 수 있다. 해동된 세포를 이용하여 제 2 견본을 수득하는데 불편함 없이 동일 개체에서 이용할 수 있는 현탁액을 수득하기 위해 제 2 배양을 개시한다.

생검 견본으로부터 진피 섬유아세포의 증식에 적합한 임의 조직 배양 기술을 이용하여 본 발명을 실행하기 위한 세포를 연장한다. 본 기술 분야에 숙지의 지식을 가진 자에게 공지된 기술은 R.I. Freshney, Ed., Animal Cell Culture: A Practical Approach(IRL Press, Oxford England, 1986) and R.I. Freshney, Ed., Culture of Animal Cells: A Manual of basic Techniques, Alan R. Liss & Co., New York, 1987)에 기술되어 있고 여기에는 참고문헌으로 첨부한다.

일차 섬유아세포 배양물의 생장에 적합한 임의 배지를 사용할 수 있다. 대부분의 경우에 배지에는 섬유아세포의 생장을 촉진시키기 위해 0.5% 내지 20%(v/v) 양의 혈청을 보충할 수 있다. 혈청농도가 높을수록 섬유아세포의 생장을 더 빨리 촉진시킨다. 적절한 구체예에서 혈청은 태아 소 혈청이고 이는 배지의 10% 농도로 첨가된다. 실시예의 배지는 포도당의 농도가 높고 2mM 글루타민, 110㎎/ℓ 피루베이트 나트륨, 10%(v/v) 태아 소 혈청 및 항생제가 보충된 배지일 수 있는데 이를 "완전배지"라 한다.

세포는 트립신처리에의해 새로운 플라스크로 계대한다. 연장을 위해 개별 플라스크는 1:3으로 분할한다. 총 배양 면적이 450㎠인 삼중 바닥, T-150 플라스크가 본 발명의 실행에 적합하다. 삼중 바닥 T-150에 약 6×10^6 세포를 접종하고 이는 약 1.8×10^7 세포를 생산할 수 있는 용량이다. 플라스크의 용량에 도달하면(일반적으로 배양 5-7일이 소요), 생장 배지는 무혈청 완전 배지로 대체하고 그 다음 세포를 배양하는데 예를 들면 37℃ 내지 약 40℃사이에서 적어도 6시간 적절하게는 12시간이상, 가장 적절하게는 16 내지 18시간동안 37℃에서 단백질 없는 배지에서 배양하는 것이다. 무혈청 배지에서 세포를 배양하는 동안에 태아 소 혈청으로부터 유도된 단백질을 제거하는데 이때 만약 단백질이 존재하는 경우에는 이는 개체에 면역원으로 작용하여 알레르기 반응을 일으키게 된다.

무혈청 배지에서 배양의 종료 시에, 세포는 트립신/EDTA에의해 조직 배양 플라스크에서 제거하고; 원심분리에의해 활발하게 세척하고 재현탁시키고; 주사용 등장 염용액 동량으로 주사하기 위해 현탁시킨다. 6개의 삼중 바닥 T-150 플라스크에서 용량에 맞게 생장시키면 약 1.0㎖ 현탁액을 만드는데 충분한 약 10^8 세포를 만들게 된다.

또는, 세포는 현탁액을 만든 후 18시간이내에 주사할 수 있는 한 4℃에서 이동시킬 수 있다. 세포는 동량의 완전배지로 현탁할 수 있는데 단, 페놀 레드 pH 지시시약이 없어야 한다. 이와 같은 수송에는 태아 소 혈청이 개체의 혈청으로 대체된다(수송 배지). 세포는 수송 배지에서 흡출되고 주사될 수 있다.

세포가 현탁된 염 또는 수송 배지의 용적은 중요하지 않다. 의사가 주사하기를 원하는 섬유아세포의 수, 치료해야할 결함의 수와 크기, 치료 결과를 얻고자하는 개체의 응급상황과 같은 인자에 따라 의사는 세포를 더 큰 용적의 배지에 현탁시키고 각 주사 부위에 이에 상응하게 더 적은 수의 세포를 주사하게 된다.

4.2. 점성 현탁액내에 주사용 세포 집단을 수득하는 또 다른 방법

피부 결함의 복구를 위해 상당량의 물질이 요구될 때, 본 발명은 주사용 세포 현탁액을 만드는 또 다른 방법을 제공한다. 이와 같은 결함의 예로는 입술 증식이 필요한 환자, 비준 폴드를 치료해야하거나 피하 결함을 치료해야할 개체를 포함한다.

또 다른 방법은 약 1×10^6 세포 집단을 수득할 때까지 전술한 방법과 동일하다. 혈장 혈병은 100㎜ 배양 접시 바닥에 형성되는데 이는 혈병을 만들기 위해 개체 혈장 2㎖과 자가 트롬빈 50 내지 100 유닛(일반적으로 50㎕에)을 첨가함으로써 조직 배양 표면을 가지도록 처리할 수 있다. 배양된 진피 섬유아세포, 1×10^6 세포/3-5㎖를 혈병의 표면에 접종하고 완전 배지에서 추가 7일간 배양한다. 7일 경에 완전 배지를 무혈청 배지로 교환한다. 배지를 2회 제거하고 시간 간격으로 무혈청 배지로 대체하고 그 다음 세포를 무혈청 배지에서 추가 14 내지 18시간동안 배양하는 프로토콜은 만족스러운 결과를 가진다. 무혈청 배지에서 배양이 완료되면 혈병은 주사기로 흡출하고 필요에 따라 주사한다.

본 발명의 또 다른 구체예는 섬유아세포를 현탁액으로 만들지 않는 것이다. 혈병은 고유의 것을 이용하거나 또는 원하는 모양으로 절단하고 혈병의 섬유아세포 접종 표면에 진피를 제거 후에 개체의 진피에 드레싱으로 이용한다.

4.3 개체에 세포의 투여

본 발명의 세포 현탁액을 이용하여 ZYDERM^R 과 ZYPLAST^{R}을 이용하는데 현재 이용되는 기술에 공지의 동일 기술을 이용하여 피부 결함을 치료한다. 전술한 장점을 가지는 세포 현탁액은 아텔로콜라겐을 대체하는데 이용한다. 하위 인접 진피와 피하 조직을 증강시키기 위한 주사용 물질의 이용과 연관된 대표적인 기술은 외과 문헌에서 찾아볼 수 있다(Gonzales, U.M., 1992, Aesthetic Plastic Surgery 16:231-4; Nicolle, F.V., 1985, Aesthetic Plastic Surgery; Pieyre, J.M., 1985 Aesthetic Plastic Surgery).

본 발명의 한구체예인 미세한 표면 얼굴 선을 치료하는 경우는 다음과 같이 실시한다. 치료할 부위를 알코올로 닦고 당겨서 팽팽한 표면을 제공한다. 주사기에는 세포 현탁액을 채우고 주사용으로 30가우지 바늘을 고정시킨다. 바늘은 가능한 한 표면에 가까이 하여 피부에 주사하고; 이때 주가시의 경사 방향은 중요하지 않다. 진피내 주사는 약간 창백한 기미가 보일 때 까지 가볍게 압력을 준다. 다수 연속 주사를 할 수 있다.

또 다른 구체예에서는 주입물은 입술의 감소형성을 치료하기 위해 또는 피하 깊이 있는 결함을 치료하기 위해 오비클라리스 근(obicularis musculature)에 위치시킨다.

또 다른 구체예에서 광범위한 여드름 반흔 지역은 중앙 또는 심층 진피 수준으로 진피를 벗겨내고 치료한다. 섬유아세포를 포함하는 혈병을 만들어 마멸된 표면을 덮고 섬유아세포 접종된 혈병 면은 마멸된 진피 표면과 나란히 한다. 적용된 혈병은 Xeroform^R, Adaptic^{R}과 같은 외과용 드레싱 또는 다른 외과용 드레싱을 사용하여 덮는다.

5. 임상 실험의 요약

전술한 방법에 따라 다양한 진피 결함의 치료를 6명의 환자에게서 실시하였다. 진단은 다음과 같았다; 웃음선(비순 폴드), 2명의 환자; 입주변 주름, 2명의 환자; 미간 깊은 주름살; 눌려진 반흔; 입술 감형성; 및 화학선 뺨 주름제거.

각 환자들은 세포 현탁액 0.1㎖을 상박에 테스트하였다. 2명의 환자에게서는 약간의 홍진이 발생되었으나 주사에 대한 다른 징후는 없었다. 3주후에 총 용적 0.1㎖의 치료용 주사를 진피 결함 부위에 실시한다. 일부 환자에서는 4주뒤에 1.0㎖의 제 2 주사를 실시하였다. 입술 증식이 있는 환자에서만 동일 결함을 복구하기 위한 제 2 주사를 실시하였다; 모든 다른 환자에게는 각 치료 부위에 단 1회 주사만 실시하였다.

환자들은 최소의 홍진이나 반응이 없었고 즉각적인 전신 또는 국소 거부 반응은 없었다. 각 환자는 주사 후에 바로 일을 할 수 있었고 각 환자들은 바로 눈에 띄는 개선점을 느낄 수 있었다.

주사와 연관된 불편함을 최소로 하였다. 이와 같은 불편함은 소 아텔로콜라겐 주사와 연관된 것보다는 적었다. 환자들은 이와 같은 치료에 만족하였고 이들의 희망은 다른 결함도 추가로 치료하기를 원하였다. 피부 결함의 교정은 치료에 대한 지식이 없는 환자의 친구나 친척에 의해 인지되었다. 촉각에 의해 감지되는 치료에 대한 일부 증거를 감지할 수 있으나 피부 치료에 대한 가시적인 후유증은 없었다.

6개월 주사후 시험 기간에 지연된 국소 또는 전신 부작용은 없었다. 종기, 울퉁불퉁함 또는 고르지 않음을 겪은 환자는 없었다. 가장 중요한 것은 관찰기간에 주사의 치료 효과에 대한 감소는 나타나지 않았고 이는 주사 시점으로부터 6개월 이상 연장되었고 이 시간동안에 소 아텔로콜라겐 주사는 흡수되는 것으로 기대된다. 일부 환자에서 장기간 이용할 수 있는 치료 효과는 시간이 지남에 따라 유익한 것으로 나타났다. 장기간 개선이 후에 나타나는 것은 주사된 섬유아세포가 대사적으로 활성이 있음을 말하는 것이고 주사 부위에 추가 세포외 매트릭스가 있다는 것을 나타내는 것이다.

본 발명은 본 발명의 각 특징을 설명하기 위한 구체예에 국한시키고자 함이 아니고 본 발명의 범위에는 이와 등가의 방법 및 성분이 포함된다. 또한, 여기에서 상술하고 있는 것에 추가하여 본 발명을 다양하게 변형할 수 있는데 이는 전술한 것으로부터 본 기술 분야에 숙지의 기술을 가진 자가 인지할 수 있을 것이다. 이와 같은 수정은 첨부된 청구항 영역에 속한다. 모든 언급된 문헌은 참고문헌으로 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

개체에서 피부 결함을 치료하기 위한 장치에 있어서,

가) 피하주사기, 주사기에는 챔버와 피스톤이 배치되어 있고, 챔버와 통하는 구멍이 있으며;

나) 현탁액, 현탁액은 개체로부터 취한 피부 섬유아세포와 제약학적으로 수용가능한 운반체 용액으로 구성되고, 이때, 섬유아세포에는 다른 세포가 포함되어 있지 않고, 배양배지에서 유도된 혈청 단백질이 포함되어 있지 않으며, 현탁액은 주사기 챔버에 수용되며;

다) 주사기 구멍에 고정된 피하 바늘로 구성된 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 2.

제 1 항에 따른 장치에 사용되는 현탁액을 만드는 방법에 있어서,

가) 사람의 피부 조직을 생검하여 수득한 피부 섬유아세포를 0.5% 내지 20% 비-인체 혈청을 포함하는 배양 배지에 계대하여, 다른 세포가 존재하지 않는 진피 섬유아세포를 제공하고;

나) 30℃ 내지 40℃ 온도 범위에서 6시간동안 무-혈청 배지에 계대된 피부 섬유아세포를 배양시키고;

다) 배양된 섬유아세포를 단백질 분해효소에 노출시켜, 섬유아세포를 현탁시키고;

라) 현탁된 섬유아세포를 제약학적 수용 가능한 운반체 용액에 첨가하여, 제약학적 현탁액을 만들고, 현탁액을 주사기 챔버에 넣는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

자생 계대된 진피 섬유아세포 삽입물을 활성 성분으로 하는 인체 피부 결함 치료용 제약학적 현탁액에 있어서, 조성물에는 섬유아세포이외에 배양 배지 유도된 혈청 단백질이나 다른 세포가 포함되어 있지 않고, 인체의 진피 또는 피하로 투여하여 인체의 피부 또는 피하조직을 장기간 증식시키는 것을 특징으로 하는 제약학적 현탁액.

청구항 4.

제 3 항에 있어서, 인체의 피부 결함은 추피(rhytid), 연장 마크(stretch mark), 눌린 반흔, 외상적 기인이 아닌 피하 눌림 또는 입술의 감형성이 되는 것을 특징으로 하는 제약학적 현탁액.

청구항 5.

제 3 항에 있어서, 현탁액에는 주사용 겔을 만들기 위해 사람 피브린이 추가로 구성된 것을 특징으로 하는 제약학적 현탁액.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 주사용 겔은 트롬빈-활성화된 동종 혈장인 것을 특징으로 하는 제약학적 현탁액.

청구항 7.

제 3 항에 있어서,

a) 0.5% 내지 20% 비-인체 혈장으로 구성된 배양 배지에 피부 생검으로부터 유래된 진피 섬유아세포를 계대하여 지방세포, 케라틴세포 및 세포외 매트릭스가 없는 진피 섬유아세포를 제공하고;

b) 30℃ 내지 40℃ 사이에서 적어도 6시간동안 무혈청 배지에 계대된 진피 섬유아세포를 배양시키고;

c) 섬유아세포를 현탁하기 위해 단백질 분해효소에 배양된 섬유아세포를 노출시키는 과정에 의해 수득된 것을 특징으로 하는 제약학적 현탁액.

청구항 8.

자생 계대된 진피 섬유아세포 삽입물을 활성 성분으로 하는 심상성좌창(acne vulgaris)의 속발증 치료용 혈병(clot)에 있어서, 혈병에는 섬유아세포이외에 배양배지 유도된 혈청 단백질이나 다른 세포가 포함되어 있지 않고, 심상성 좌창이 있는 부위를 진피까지 벗겨내고, 벗겨낸 부위에 혈병을 덧발라 섬유아세포가 진피에 붙어있게 하는 방법으로 심상성 좌창 속발증 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 심상성 좌창 속발증 치료용 혈병.