(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0142211
(43) 공개일자 2017년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3691 (2013.01)
A61L 27/365 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7036136(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년06월16일
심사청구일자 2017년12월14일
(62) 원출원 특허 10-2016-7001191
원출원일자(국제) 2014년06월16일
심사청구일자 2016년01월29일
(85) 번역문제출일자 2017년12월14일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2014/051845
(87) 국제공개번호 WO 2014/202958
국제공개일자 2014년12월24일
(30) 우선권주장
1310773.5 2013년06월17일 영국(GB)

(71) 출원인
비데레젠 리미티드
영국 엘3 5티에프 리버풀 131 마운트 플레젠트 리버풀 사이언스 파크 이노베이션 센터 1
(72) 발명자
안사리 타헤라 이크밸
영국 에이치에이1 3유제이 해로우 와포드 로드 노쓰윅 파크 하스피터
시본스 폴 데이비드
영국 에이치에이1 3유제이 해로우 와포드 로드 노쓰윅 파크 하스피터
(74) 대리인
유미특허법인

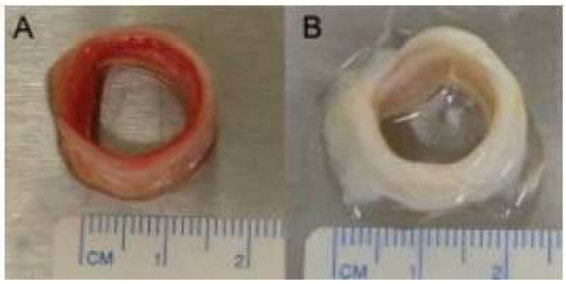
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 **임플란트 및 음압 하 관류에 의한 조직의 탈세포화를 통한 임플란트의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은, 조직에 하나 이상의 탈세포화 매질을 실질적으로 관류 전체 기간 동안 적용되는 음압 하에 관류하는 단계를 포함하는, 간질 조직, 결합 조직 또는 지지 조직으로부터 임플란트를 제조하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/3662 (2013.01)
A61L 27/3687 (2013.01)
C08B 37/0063 (2013.01)
C12N 5/0602 (2013.01)
C12N 5/0652 (2013.01)
C12N 2501/70 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

기관 (trachea), 기관의 일부 또는 기관 조직; 및 후두, 후두의 일부 또는 후두 조직으로부터 선택된 조직으로부터 임플란트를 제조하는 방법으로서,

상기 조직의 전체에 하나 이상의 탈세포화 매질 (decellularisation medium)을 음압 하에 관류 (perfusion)하는 하나 이상의 관류 단계로서, 상기 음압은 관류의 전체 기간 동안 적용되는 것인, 하나 이상의 관류 단계를 포함하고,

상기 관류 단계 또는 각각의 관류 단계 이후에 하나 이상의 세척 단계를 더 포함하고,

상기 방법 전체가 오직 음압 하에서만 수행되고, 상기 음압은 5kPa 이하인 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탈세포화 매질 또는 각각의 탈세포화 매질이 디터전트 (detergent) 및/또는 효소를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방법이 디터전트 탈세포화 매질을 포함하는 하나 이상의 관류 단계 및 뉴클레아제 탈세포화 매질을 포함하는 하나 이상의 관류 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

각각의 관류 단계 사이의 세척 단계 및 마지막 관류 단계 이후의 세척 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

디터전트 탈세포화 매질을 포함하는 제1 관류 단계,

뉴클레아제 탈세포화 매질을 포함하는 제2 관류 단계, 및

뉴클레아제 탈세포화 매질을 포함하는 제3 관류 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 관류 단계 또는 각각의 관류 단계가 25℃ 내지 40℃에서 수행되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 각각의 관류 단계가 1시간 내지 96시간 동안 수행되는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

각각의 세척 단계가 15분 내지 96시간 동안 수행되는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

각각의 관류 단계가 1kPa 이하의 압력에서 수행되는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

각각의 관류 단계가 0.5kPa 이하의 압력에서 수행되는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 방법 전체가 1kPa 이하의 압력에서 수행되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 방법 전체가 0.5kPa 이하의 압력에서 수행되는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 방법 전체가 0.1kPa 이하에서 수행되는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

각각의 관류 단계가 펌프를 이용한 상기 탈세포화 매질의 펌핑 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 펌프가 진공-발생 장치에 연결되거나 또는 진공 펌프인, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 방법은 상기 임플란트에 세포를 재-접종하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 세포는 자가 세포 (autologous cell) 및/또는 동종이형 세포 (allogenic cell)를 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 탈세포화된 조직 임플란트.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 임플란트가, 임플란트가 유래된 조직의 오리지날 섬유 구조 (fibre architecture) 및 분자 초미세구조를 나타내는 콜라겐 섬유를 포함하는, 임플란트.

청구항 20

제19항에 있어서,

연골 세포가 없는, 임플란트.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 조직이, 내강 상피, 점막하 샘 (sub-mucosal gland), 기관근 (trachealis muscle) 및 바깥쪽 외막 (outer adventitia) 내부에 핵이 없는, 기관, 기관의 일부 또는 기관 조직인, 임플란트.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 임플란트가 오리지날 조직으로부터 유지되는 세포외 기질 글리코사미노글리칸을 포함하는, 임플란트.

청구항 23

외과적으로 사용하기 위한 제19항에 따른 임플란트.

청구항 24

제19항에 따른 임플란트를 이용하여 제조되는 수술용 제품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 임플란트 및 임플란트의 제조 방법에 관한 것이다. 상세하게는, 본 발명은 연골질 조직 또는 석회화된 조직, 예를 들어 기관, 힘줄 및 뼈로부터 유래되는 임플란트를 제조하는데 유용하다.

배 경 기 술

[0002] 생물로부터 유래된 스캐폴드를 포함하는 임플란트는 다양한 여러가지 질환 및 병태를 치료하는데 있어 조직/장기 복구 및 재생에 중요한 옵션이 되고 있다. 아직 해결되지 않은 주요 과제는 조직으로부터 항원을 제시하는 세포성 물질을 제거한 다음 조직으로 스캐폴드를 제조해야 한다는 것이다. 특히, 기관 조직과 같은 연골질 조직을 포함하여, 상대적으로 조밀한 간질 조직, 결합 조직 또는 지지 조직을 탈세포화 (decellularization)하는 경우, 조직으로부터 모든 항원-제시 세포를 실질적으로 제거하기가 불가능한 것은 아니지만 매우 어렵다.

[0003] 긴 기관지의 병변과 같이, 간질, 결합 및 지지 조직에의 손상은 외과의에게 여전히 어려운 과제로 남아있다. 예를 들어, 어린이의 경우, 기관지 전체 길이에서 4.5 - 6 cm 또는 30% 이상에서 나타나는 선천적인 결함, 외상 또는 종양으로 인한 손상은 일차적인 봉합 (primary closure)을 통해서는 치료하기 어렵다. 따라서, 이들 환자는 외과적으로 치료가능한 것으로 거의 고려되지 않으며, 기관 조직으로부터 유래된 임플란트를 사용하는 것이 바람직한 대안이다. 기관 도관을 이용한 재구축은 외과적인 적용을 확장시켜, 삶의 질을 개선시킬 것이다.

[0004] 재생 의학 분야에서의 최근 진보는 특히 조직 가공된 대체 기관 스캐폴드에 대해 의미있는 전망을 보인다. 이상적인 대체는 가능한 천연 구조에 가까워서 안정성과 비-면역원성 특성을 제공해야 한다. 이러한 기준을 충족시키기 위해, 상당한 연구 자원들이 출발 포인트로서 생물 물질을 이용하는 방향으로 투입되고 있다. 동종이형 또는 이종 물질을 이용해 재생 목적의 스캐폴드를 제조하는데에는 모든 항원들의 완전한 제거가 필요하면서도, 세포 부착을 지지할 수 있고 공기 통풍을 위해 충분한 견고성 (rigidity)을 제공할 수 있는 수준으로 세포외 기질을 유지하여야 한다.

[0005] 공지된 탈세포화 기법들은 여러가지 화학적 및 생물학적 시약들을 사용해 항원 제시 세포와 세포 입자들을 세척 제거한다. 기관 조직을 탈세포화하기 위해 확립된 한가지 프로토콜은 디터전트-효소 방법을 기반으로 하는데, 이때 세포들은 다양한 디터전트, 효소 및 기타 시약을 이용한 관류에 의해 기관 조직으로부터 제거된다. 특별한 상황의 소수의 사례에서 성공적으로 이식된 적절한 스캐폴드가 제시되고 있지만, 아직까지는 표준적인 임상 실무에 도달하지 못하였다. 한가지 이유는 대략 3주가 소요되어 스캐폴드 제조 기간이 길고, 시간 지연으로 인

해 환자에게 부수적인 위험성이 존재한다는 것이다.

[0006] 임상적으로 사용하기 위한 표준화된 "출하 대기 (off-the-shelf)" 스캐폴드에는 정확한 해부학적, 기능적 및 생체역학적 특징들 뿐만 아니라 적절한 시간 안에 제조할 수 있는 실현 가능성이 요구된다. 조직의 탈세포화를 개선하기 위해, 여러가지 효소 및 디터전트 조합들을 망라하는, 여러가지 방법들이 이용가능하다. 이들 시약들 대부분이 세포외 기질을 변형시키는 것으로 알려져 있어, 세포외 기질의 변형을 완화하거나 방지하기 위해 공지된 기법과는 다른 방식이 여전히 요구되고 있다.

[0007] 연골과 같은 간질, 결합 및 지지 조직은 특히 조밀한 조직이기 때문에, 상대적으로 짧은 시간동안 탈세포화제를 조직 심부로까지 전달하면서도 특히 기관 임플란트 제조시 세포외 기질의 조직 초미세 구조에 영향을 주지 않는 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명은, 상대적으로 짧은 시간내에 제조할 수 있으면서도 모든 항원-제시 세포가 제거된 실질적으로 무손상 세포외 기질을 유지하는, 특히 기관과 같은 연골질 조직 등의 간질, 결합 또는 지지 조직을 기반으로 하는, 조직/장기 복구용 임플란트의 개선된 제조 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 제1 측면은, 조직에 하나 이상의 탈세포화 매질을 실질적으로 관류 전체 기간 동안 적용되는 음압 하에 관류 (perfusion)하는 단계를 포함하는, 조직으로부터 임플란트를 제조하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 제2 측면은, 조직에 하나 이상의 탈세포화 매질을 실질적으로 관류 전 기간 동안 적용되는 음압 하에 관류하는 단계를 포함하는, 간질, 결합 또는 지지 조직으로부터 임플란트를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 적절한 간질, 결합 또는 지지 조직으로는, 연골성, 섬유연골성 및 석회화된 연골성 조직, 예를 들어, 기관, 후두 및 연골 자체, 뼈, 힘줄, 인대, 뼈-힘줄, 뼈-인대, 신경 조직, 큰 혈관, 예컨대 동맥과 정맥, 및 활막을 포함한다.

[0012] 본 발명의 방법으로 이용될 수 있는, 비-간질, 결합 또는 지지 조직으로는, 뇌, 식도, 장 (소장 및 대장), 췌장, 비장, 간, 폐, 신장, 림프, 작은 혈관을 포함한다.

[0013] "음압"은 주위 압력 보다 낮은 압력, 또는 일부 또는 실질적으로 완전한 진공을 포함한다.

[0014] 제조되는 스캐폴드는 조직의 복구 및 재생을 위한 우수한 임플란트를 제공한다.

[0015] 탈세포화 공정은, 탈세포화 매질 관류 단계(들) 외에도, 한 단계 이상의 세척 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 세척 단계 또는 그 각각은 세척 단계 또는 각각의 세척 단계의 실질적으로 전 기간동안 음압 하에 수행된다.

[0016] 일부 구현예들에서, 실질적으로 전체 임플란트 제조 방법이 음압 하에 수행된다.

[0017] 탈세포화 매질은, 세포외 기질 (ECM) 단백질에 대한 손상은 최소화하면서 조직으로부터 세포들 및 세포성 성분을 제거하여, ECM 구조와 기능이 가능한 비슷하게 보존된 스캐폴드가 제조되도록, 선택된다.

[0018] 적합한 탈세포화 매질은, 소듐 도데실 설페이트 (SDS), 소듐 데옥시콜레이트 (SOC) 등의 디터전트, 친수성 폴리옥시에틸렌-옥사이드 및 소수성 탄화수소 모이어티를 포함하는 디터전트, 예컨대 Triton X-100 (RTM), 효소, 예를 들어 단백질분해 효소, 예로 트립신 및 뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제, 예로 DNase I 및 리보뉴클레아제, 예로 RNase, 및 이들의 조합을 포함한다. 또한, 하나 이상의 탈세포화 매질에 트리부틸-n-포스페이트 (TBnP)도 포함될 수 있다. TBnP는 단백질-단백질 상호작용을 파괴하는 용매이다.

[0019] 본 방법은, 바람직하게는, 조직에 2 이상의 탈세포화 매질을 관류하는 단계를 포함한다. 적합하게는, 본 방법은, 조직에 하나 이상의 디터전트와 하나 이상의 뉴클레아제를 관류하는 단계를 포함한다. 일부 구현예들에서, 본 방법은 조직에 디터전트를 관류하는 단계 및 상기 조직에 뉴클레아제를 관류하는 단계를 포함하며, 디터전트 관류 단계는 뉴클레아제 관류 단계 이전에 수행될 수 있다. 일부 구현예들에서, 각 디터전트 관류 단계는, 음압 하에 수행되며, 일부 다른 구현예에서, 디터전트 관류 단계와 뉴클레아제 관류 단계 둘다가 음압 하에 수행

된다.

[0020] 각 관류 단계는 15℃ - 45℃, 또는 30℃ - 40℃의 온도에서 수행될 수 있다. 일부 구현예들에서, 관류 단계는 약 37℃에서 수행되며, 이는 특히 관류 단계가 뉴클레아제 물질을 포함하는 경우에 유익하다. 관류 단계가 디터전트 관류 단계인 경우에는, 15℃ - 40℃, 예컨대 주위 온도 또는 실온에서 수행될 수 있다.

[0021] 일부 구현예들에서, 본 방법은 각 관류 단계 사이에 세척 단계를 포함할 수 있다. 세척 단계는 임의의 적정 세척 매질 또는 예를 들어 포스페이트 완충화된 염수 (PBS), 행크스 평균 염 용액 또는 멸균수와 같은 매질을 이용할 수 있다. 세척 단계(들)는 1℃ - 8℃, 또는 2℃ - 6℃의 온도에서 수행될 수 있다. 다른 구현예에서, 세척 단계 또는 각 세척 단계는 15℃ - 40℃의 온도, 예컨대 약 37℃, 또는 주위 온도 또는 실온에서 수행될 수 있다. 관류 단계들 사이에 수행되는 각 세척 단계는 음압 하에 수행될 수 있으며, 일부 구현예들에서, 세척 단계들은 모두 음압 하에 수행된다. 세척 단계는 조직을 세척 매질 중에 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 관류 및/또는 세척은 항생제 및/또는 항진균제의 존재 하에 수행될 수 있다.

[0023] 본 방법은, 뉴클레아제를 이용한 관류 단계 2회 이상 및 이후 디터전트 또는 디터전트 혼합물을 이용한 관류 단계 1회 이상과 각 단계 사이의 세척 매질을 이용한 세척 단계를 포함하는, 일련의 단계들로 조직을 관류하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서, 일련의 단계들은, 데옥시리보뉴클레아제 및 리보뉴클레아제의 혼합물을 이용한 관류 단계 2회 이상 및 이후의 이온성 디터전트와 비-이온성 디터전트의 혼합물을 이용한 관류 단계를 포함하며, 각 단계들 사이에 식염수 (saline solution)를 이용한 세척이 이루어진다. 바람직한 구현예에서, 디터전트의 혼합물은 소듐 데옥시콜레이트와 Triton X-100 (RTM)을 포함하며, 데옥시리보뉴클레아제는 DNAse I이고, 리보뉴클레아제는 RNAse이다.

[0024] 적절하게는, 각 관류 단계는 1시간 - 96시간 동안, 더 바람직하게는 18시간 - 84시간 동안, 가장 바람직하게는 24시간 - 72시간 동안 수행된다. 관류 단계가 디터전트 물질의 관류를 포함하는 경우, 이 단계는 12시간 이상, 18시간 이상 또는 24시간 이상 수행될 수 있다. 관류 단계가 뉴클레아제의 관류를 포함하는 경우, 이 단계는 1시간 이상, 18시간 이상 또는 24시간 이상 동안 수행될 수 있다.

[0025] 적절하게는, 각 세척 단계는 15분 내지 96시간 동안, 예를 들어 12시간 - 96시간 동안, 더 바람직하게는 18시간 - 72시간 동안, 또는 24시간 - 72시간 동안 수행될 수 있다. 각 관류 단계 이전 또는 이후에 복수의 세척 단계가 존재할 수 있으며, 복수의 세척 단계들은 각각 독립적으로 15분 - 96시간 동안 수행될 수 있다.

[0026] 본 방법은 식염수 등의 적정 매질 중에 탈세포화된 조직을 보관하는 단계를 더 포함할 수 있다. 식염수는 1종 이상의 항생제 및/또는 항진균제 물질을 포함할 수 있다. 식염수는 포스페이트-완충화된 염수 (PBS) 용액 또는 행크스 평형 염 용액 (선택적으로, Ca 및/또는 Mg가 첨가됨) 둘다를 포함할 수 있다. 보관은 바람직하게는 1℃ 내지 6℃, 예를 들어 약 4℃의 온도에서 이루어진다.

[0027] 관류 단계 또는 단계들은 음압 하에 수행된다. 간질, 결합 또는 지지 조직이 사용되는 방법의 경우, 압력은 바람직하게는 주위 온도에서 10kPa 이하, 5kPa 이하, 2kPa 이하, 1kPa 이하 또는 0.5kPa 이하이다. 일부 구현예들에서, 압력은 1kPa 이하, 0.2kPa 이하 또는 0.1kPa 이하이다. 조직을 탈세포화제를 이용해 상기한 감압 하에 관류하는 것은, 조직이 관류 용액 및 탈세포화 매질 (또는 매질들)을 흡수하는 속도를 높일 뿐만 아니라 음압을 이용하지 않았을 경우와 비교해 탈세포화 매질 (매질들)을 조직의 더 심부로 침투시켜, 따라서 전체 조직이 이들 매질 (매질들)로 관류되어 상대적으로 짧은 기간내에 실질적으로 완전히 탈세포화할 수 있다. 아울러, 세척 단계가 음압 하에 수행되는 경우, 탈세포화 효과는 유지 및 강화된다. 간질, 결합 또는 지지 조직 이외의 다른 조직이 사용되는 방법의 경우 (예, 식도, 장, 간, 췌장, 신장, 비장, 폐 및 작은 혈관), 압력은 80kPa 이하, 70kPa 이하, 60kPa 이하, 50kPa 이하, 40kPa 이하, 30kPa 이하, 20kPa 이하, 10kPa 이하, 5kPa 이하, 2kPa 이하 또는 1kPa 이하일 수 있다. 일반적으로, 간질, 결합 또는 지지 조직 이외의 조직에 대한 압력은 간질, 결합 또는 지지 조직에 대한 압력 보다 높을 것이다.

[0028] 일부 구현예들에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함한다:

[0029] a) 조직에 뉴클레아제 매질을 1시간 - 36시간 동안 관류하는 단계;

[0030] b) 조직을 12시간 - 72시간 동안 세척하는 단계;

[0031] c) 조직에 디터전트 매질을 12시간 - 36시간 동안 관류하는 단계; 및

[0032] d) 조직을 다시 12시간 - 36시간 동안 뉴클레아제 매질로 관류하는 단계.

[0033] 조직은 본원에 전술한 바와 같이 간질, 결합 또는 지지 조직일 수 있거나, 또는 본원에 전술한 바와 같이 간질, 결합 또는 지지 조직 이외의 조직일 수 있다.

[0034] 단계 a) 및 d)의 뉴클레아제 매질은, 바람직하게는, 동일한 뉴클레아제 매질이며, 이는 DNAseI과 RNAse를 포함한다.

[0035] 단계 c)에서 디터전트 매질은 소듐 데옥시콜레이트와 Triton X-100 (RTM)로 된 혼합물과 같은 비-이온성 디터전트와 이온성 디터전트의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0036] a), c) 및 d)의 관류 단계는 30℃ - 40℃에서, 예를 들어 약 37℃에서 수행될 수 있다. 세척 단계는 2℃ - 6℃, 예컨대 약 4℃, 또는 15℃ - 40℃, 예컨대 약 37℃, 또는 대략 주위 온도 또는 실온에서 수행될 수 있다.

[0037] 단계 d) 이후에, 탈세포화된 조직을 식염수 중에 1℃ - 6℃에서, 예를 들어 약 4℃에서 보관하는 단계 e)가 존재할 수 있다. 식염수는 항생제 및/또는 항진균제를 포함할 수 있다.

[0038] 단계 a), c) 및 d)는 음압 하에 모두 수행되며, 음압은, 간질, 결합 또는 지지 조직의 경우에는 10kPa 이하, 5kPa 이하, 2kPa 이하, 1kPa 이하 또는 0.5kPa 이하, 바람직하게는 0.2kPa 이하, 더 바람직하게는 0.1kPa 이하일 수 있으며, 임의의 다른 적정 조직의 경우에는 80kPa 이하, 50kPa 이하, 30kPa 이하 또는 10kPa 이하일 수 있다.

[0039] 단계 a) - d)의 각 단계는, 바람직하게는, 간질, 결합 또는 지지 조직의 경우에는 주위 온도에서 10kPa 이하, 5kPa 이하, 2kPa 이하, 1kPa 이하 또는 0.5kPa 이하, 바람직하게는 0.2kPa 이하 또는 더 바람직하게는 0.1kPa 이하일 수 있으며, 임의의 다른 적정 조직의 경우에는 80kPa 이하, 50kPa 이하, 30kPa 이하 또는 10kPa 이하일 수 있는, 음압 하에 수행된다.

[0040] a) - d) 단계들 중 임의 단계들의 사이에 및/또는 단계 d) 이후에, 15분 - 72시간의 그외 세척 단계가 존재할 수 있다.

[0041] 선택적으로, 본 발명의 제1 또는 제2 측면의 방법은 가공된 조직을 가교하는 단계를 포함할 수 있다. 임의의 적절한 가교제, 예를 들어, 헥사메틸렌 다이이소시아네이트 (HMDI), 게니핀 (genipin), 퀘르세틴 또는 헤파린 중 1종 이상이 사용될 수 있다. 전형적으로, 본 발명이 가교 단계를 포함하는 경우, 이는 조직의 탈세포화 이후에 이루어진다.

[0042] 가교는, 임플란트가 기관으로부터 제조되는 경우에, 기관연화 (tracheomalacia)를 방지하는데 일조하므로, 특히 유익하다.

[0043] 본 방법을 이용하여, 세포가 실질적으로 제거된, 실질적으로 탈세포화된 스캐폴드를 제공할 수 있으며, 스캐폴드는 유해한 조직 반응성 또는 면역 반응이 생체내에서 관찰되지 않도록 충분한 세포성 물질 및 부속된 성분이 제거된 것이다. 반응성은 피하 이식에 의해 관찰할 수 있다. 실질적으로 탈세포화된 스캐폴드는 현미경 x40 배율로 관찰하였을 때 세포가 충분히 결여되어 있다.

[0044] 연골질 조직이 사용되는 경우, 본 발명의 방법으로 소강 (lacunae)내 모든 연골 세포들이 실질적으로 제거되어 연골질 조직의 탈세포화가 이루어진다. 아울러, 연골질 물질이 기관인 경우, 내강 상피 (점막), 점막하 샘, 기관근 및 바깥쪽 외막 (outer adventitia) 내부의 실질적으로 모든 핵들이 제거된다.

[0045] 조직 및 전체 장기의 탈세포화 프로세스에 대한 최근 리뷰에서는 (Crapo *et* al. (2011) *Biomaterials* 32: 3233-3243), 다음과 같은 최소 기준이 생체내 유해 반응 부재 외에도, 세포외 기질 (ECM) 탈세포화 의도를 충족시키기에 충분하다는 것을 제시하였다: ECM 건조 중량 mg 당 dsDNA <50ng; 단편 길이 <200bp; 및 DAPI 또는 H&E로 염색된 조직내 가시적인 핵 물질의 부재.

[0046] 본 발명의 방법에 의해 제조된 탈세포화된 조직은 이들 기준을 충족시킨다.

[0047] 잔류 스캐폴드는 ECM, 특히 콜라겐을 포함한다. 바람직하게는, ECM의 구조가 스캐폴드에 적어도 일부 보존되며, 바람직하게는 실질적으로 보존된다. 따라서, 스캐폴드는 이것이 유래된 천연 조직 물질의 오리지날 섬유 구조 및 분자 초미세 구조를 나타내는 콜라겐 섬유를 포함할 수 있다. 일부 느슨함 또는 언-폴딩 (unfolding)이 스캐폴드의 구조적 완전성에 영향을 주지 않으면서 허용가능하지만, 이들 섬유성 조직 단백질들의 천연 3차원 구조는 바람직하게는 유지된다.

[0048] 스캐폴드의 오리지날에 특이적인 세포성 성분 및/또는 이의 이식 위치는, 탈세포화된 조직 또는 장기내 섬유질

의 폴리머성 구조가 적어도 일부 온전하게 유지되는 경우에만, ECM의 적절한 구조상 리모델링을 발동시킨다는 것이 공지되어 있다. 따라서, ECM은, 기능적 재생 리모델링을 유발하고 조직 증식을 위한 성공적인 스캐폴드를 제공하기에, 임의의 합성 매트릭스에 비해 보다 적합하다.

[0049] 기능성 ECM 단백질의 보존은 또한 스캐폴드의 생물 활성, 구조적 완전성, 내구성 및 물리-화학적 특성들을 유지하는데에도 중요하다. 단백질 및 글리코스아미노글리칸 (GAG)의 분자 구조에서부터 조직의 거시적 초미세구조(macroscopic ultrastructure)에 이르는 계층적인 구조의 유지 및 보존은, 선천적인 물리-기계적 특성들에 있어 중요하며, 또한 조직의 기능에도 중요하다. 또한, 탈세포화 및 조직 가공 동안에 3차원 구조의 보존 역시 조직의 궁극적인 세포 재군락화 (repopulation)와 세포 및 조직-특이적인 기능의 재생을 개선시킨다.

[0050] 본 발명은, 바람직하게는, 실질적으로 세포-조합된 GAG를 제거하면서, ECM-유래/위치된 GAG는 보존한다. 따라서, 탈세포화 과정은 통상적으로 전체 GAG를 감소시키지만, ECM-조합된 GAG는 바람직하게는 상당히 보존된다. 이는, ECM GAG와 여러가지 세포 타입들 간에 "상호-작용 (cross-talk)"이 존재하여, 세포 이동 및 세포 분화를 구동하는데 일조하기 때문에, 중요하다. 또한, ECM GAG는 성장인자들에 대한 저장 또는 싱크 (sink)로서 이용되어, 스캐폴드/임플란트 이식 후 조직 재생을 지시하는데 일조한다.

[0051] 관류 단계 또는 단계들은 진공-형성 장치에 연결된 펌프 장치 또는 진공 펌브를 포함하는 장치를 이용해 수행할 수 있다. 장치는, 예를 들어 탈세포화 매질을 전달하도록 배열된, 관, 호스 또는 파이프 등을 포함할 수 있으며, 하나 이상의 세척 단계를 포함하는 본 발명의 방법의 구현예들에서 임의의 세척 매질을 전달하기 위해 사용될 수도 있는, 관류 회로 (perfusion circuit)를 포함할 수 있다.

[0052] 인큐베이션 챔버는 조직을 수용하기 위해 제공될 수 있으며, 탈세포화 매질은 인큐베이션 챔버를 통해 펌핑될 수 있다.

[0053] 본 발명의 제3 측면은, 본 발명의 제1 또는 제2 측면에 따른 또는 본원에 기술된 임의의 공정에 따라 제조된 임플란트를 제공한다.

[0054] 본 발명의 제4 측면은, 본원에 전술한 바와 같은 장치를 이용해 본 발명의 제1 또는 제2 측면에 다른 임플란트의 제조 방법을 제공한다.

[0055] 본 발명의 제5 측면은, 본원에 기술된 임플란트를 환자에게 외과적으로 이식하는 단계를 포함하는 치료 방법을 제공한다.

[0056] 본 발명의 제6 측면은 본원의 임플란트의 외과적 용도를 제공한다.

[0057] 본 발명의 제7 측면은 외과적으로 사용하기 위한 본원에 기술된 임플란트를 제공한다.

[0058] 본 발명의 제8 측면은 외과용 제품의 제조에 있어 본원에 기술된 임플란트의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0059] 본 발명이 보다 명확하게 이해될 수 있도록, 본 발명의 구현예들이 단지 예로서 첨부된 도면을 참조하여 기술될 것이다.

도 1은 (A) 대조군 (탈세포화되지 않음) 및 (B) 본 발명의 방법을 이용해 탈세포화된 인간 기관 단편에 대한 거시적인 외양을 보여주는 사진이다.

도 2는 탈세포화 공정 중에 진공을 사용한 경우와 사용하지 않은 경우에 탈세포화된 돼지 기관에 대한 조직학적 평가를 보여주는 현미경 사진으로, A & D의 사진은 핵(*)을 가진 무손상 세포의 존재를 보여주는 정상 대조군 조직이고, B & E는 관류 중에 음압을 적용하지 않고 탈세포화한 조직을 나타낸 것이고 (주의: 연골 소강 (*) 안에 무손상 연골 세포가 존재함), C & F는 본 발명의 방법을 이용한 탈세포화를 도시한 것이다 온전한 핵은 존재하지 않으며, 연골 소강이 비어있음(°)).

도 3은 대조군 돼지 조직과, 본 발명의 방법으로 또는 본 발명의 방법을 이용하지 않고 탈세포화한 돼지 조직에 대한 DNA 정량 결과와, 인간 기관 대조군 조직과 본 발명의 방법을 이용해 탈세포화한 조직에 대한 DNA 정량 결과를 도시한 것이다.

도 4는 본 발명의 방법을 이용한 인간 기관의 탈세포화를 보여주는 현미경 사진으로, A&C의 사진은 정상 대조군 조직 (온전한 연골 세포 (**)와 외부 결합 조직 안의 핵 물질 (**))이고, B&C는 본 발명의 방법을 이용해 제조

된 탈세포화된 조직 (연골 소강이 비어있음 (°))을 나타낸 것이다.

도 5는 PSR-ME 엘라스틴 염색된 부분을 보여주는 현미경 사진으로, A - H 사진들은 명시야 현미경 광 하에 취득한, 돼지 (A&B, E&F) 및 인간 (C&D, G&H) 기관 조직의 사진이고, I - L (I&J 돼지, K&L 인간)은 편광 (polarised light) 하에 취한 사진이고, A&E&I, C&G&K 사진들에서 대조군 조직은 B&F&J, D&H&L 사진들에서 본 발명의 방법에 의해 제조된 탈세포화된 조직과 비교하여 도시된다. 화살 표시는 보존된 탄성 섬유 (e) 및 콜라겐 섬유 (c)를 표시한다.

도 6은 돼지 및 인간 기관의 대조군 조직과 탈세포화된 조직의 콜라겐 함량 결과를 보여주는 막대 차트이다. 돼지 조직의 경우, 진공처리 없이 탈세포화한 경우의 처음 데이타 (n=2)가 포함된다. 양쪽 종들에서 대조군 조직과 탈세포화된 기관 샘플 간에 유의한 차이는 보이지 않는다.

도 7은 A, C, E가 대조군 조직이고, B, D, F가 본 발명의 방법에 따라 제조된 탈세포화된 기관 조직인, 기관 조직들의 일련의 SEM 사진이다. 콜라겐 번들, A-D는 돼지의 기관이고, E 및 F는 인간의 기관이다. "*"로 표시된 화살표는 대조군 조직 (C 사진)에서 세포를 나타내며, "f"로 표시된 화살표는 콜라겐 섬유를 가르킨다.

도 8은 돼지 기관 (A&E)의 대조군 조직, 인간 기관 (C&G)의 대조군 조직을 본 발명에 따라 제조된 탈세포화된 돼지 기관 (B&F) 및 인간 기관 (D&H)과 비교하여 나타낸 알시안 블루 염색한 현미경 사진이다.

도 9는 대조군 조직 및 탈세포화된 (본 발명의 방법을 이용해 제조된 것과 이용하지 않고 제조된 것) 조직 샘플들을 비교한 돼지 및 인간 조직의 정량적인 GAG 분석 결과를 도시한 막대 차트이다.

도 10은 기관 샘플의 생체역학적 검사 장치를 개략적으로 예시한 것이다.

도 11은 돼지의 대조군 (A) 및 본 발명의 방법에 따라 제조된 탈세포화된 (C) 기관과 인간의 대조군 (B) 및 본 발명의 방법에 따라 제조된 탈세포화된 (D) 기관 조직에 대한 MHC-I 면역염색 사진을 보여주는 현미경 사진이다. "*"로 표시된 화살표는 세포 막의 양성 염색을 나타내며, "° "로 표시되는 화살표는 양성 염색시 MHC-I 염료가 있을 것으로 기대되는 영역을 표시한다. HLA-1으로 염색된 비-탈세포화된 인간 기관은 (E)에 도시된다. HLA-1으로 염색된 비-탈세포화된 인간 기관은 (F)에 도시된다. HLA-1 양성 염색은 단편 전체에서 볼 수 있으며, 상피는 강한 양성을 나타낸다. (G)는 본 발명에 따라 제조된 탈-세포화된 인간 기관의 HLA-1 염색 (에오신으로 대조 염색됨)을 나타낸 것으로, 연골 및 콜라겐에서는 양성이 확인되지 않는다. (H)는 HLA-1으로 밤새 염색하고 에오신으로 대조 염색된 탈-세포화된 인간 기관 IHC를 나타낸 것이다.

도 12는 생체적합성 실험의 거시 관점의 이미지를 보여주는 일련의 사진이다. 이미지 A, 화살표 "t"는 스프레그 다울리 랫에서 본 발명의 방법에 따라 제조된 인간 탈-세포화된 기관 샘플들의 이식을 표시한다. 이미지 B는 이식 영역 (화살표 "I")을 보여주며, 이미지 C, 화살표 "s"는 2주 후 이식한 조직 샘플이다.

도 13은 이종 동물 모델에서 이식 2주 후 본 발명에 따라 제조된 이식된 인간 탈-세포화된 기관 샘플에 대한 H&E 염색 현미경 사진이다. 사진 A에는 기저 근육 (m)과 이식된 스캐폴드 (s)를 표시하는 화살표가 삽입되어 있다. B&C는 체외 이식 (explantation) 이후의 이미지로서, 영역에는 신혈관이 형성된 조직 (v)과 약한 급성 염증에 해당되는 일부 호중구 세포로 된 얇은 섬유성 피막 (*)이 존재한다.

도 14는 랫에 이식하고 2주 후, 본 발명에 따라 제조된 탈-세포화된 인간 기관 스캐폴드를 PSR-ME로 염색한 현미경 사진이다. 화살표는 연골질 부위 (*) 및 콜라겐 섬유 (c)를 가진 스캐폴드의 보존된 세포외 매트릭스 구조를 표시한다.

도 15는 본 발명에 따라 제조된 탈세포화된 돼지 및 인간 기관 조직 샘플에서의 DNA 함량을 최대 1kba의 대조군 마커와 비교하여 나타낸 DNA 겔 전기영동 결과를 도시한 것이다.

도 16은 본 발명에 따라 제조된 돼지의 탈세포화된 힘줄 조직을 H&E 염색한 현미경 사진이다.

도 17은 탈세포화 동안에 음압을 사용하지 않고 제조된 대조군 돼지 탈세포화된 힘줄 조직을 H&E 염색한 현미경 사진이다.

도 18은 H&E 염색된 돼지 뼈 샘플의 현미경 사진이다. (a) 대조군 샘플 (탈세포화 동안에 음압 적용 안함), 배율 x40. (b) 대조군 샘플, 배율 x200. (c) 1% SDS, 36hr 저장액 (hypotonic solution), 진공 샘플, 배율 x40. (d) 1% SDS, 36hr 저장액, 진공 샘플, 배율 x200. 약어 - (AD) 지방세포; (HSC) 조혈 줄기 세포. (OC); 소주골 (trabecular bone)의 소강내 골세포; (TB) 핑크로 염색된 소주골.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 실시예

[0061] 실시예 1

[0062] *본 발명의 방법에 따른 탈세포화된 기관 스캐폴드 및 대조군의 제조*

[0063] 모든 동물 수술과 관리는 1986의 영국 내무성 동물 (과학 지침) 법률에 따라 노스윅 파크 의학 연구 기관 (NPIMR)으로부터 윤리적인 승인을 받아 수행하였다. 기관은 표준 실험 조건 하에 관련없는 실험들에서 나온 라지-화이트/ 란드라스 교배 돼지로부터 수득하였다. 마취제 과다 투여에 의해 안락사시킨 후, 기관을 회수하여 신선하게 (대조군) 사용하거나 또는 탈세포화하여 사용하였다. 탈세포화를 위해, 모든 결합 조직들을 제거하고, 기관을 행크스 평균 염 용액 (Sigma-Aldrich)에서 헹구었다. 그런 후, 조직을 최소 24시간 -20℃에 보관하였다. 인간의 기관은 NHS 혈액 및 이식 (NHSBT)으로부터 입수하였다. 알려진 기도 질환을 앓았던 적 없는 2개의 사체에서 사체의 기관을 회수하였다. 최초 이동과 보관은 행크스 완충화된 용액 중에 -80℃에서 행하였다. 탈세포화를 위해, 이들 기관을 이후 -20℃로 이동시켰다.

[0064] *본 발명에 따른 탈세포화 및 대조군 탈세포화*

[0065] 총 열한개 (11)의 돼지 기관을 탈세포화하고, 일곱개 (7)는 본 발명의 방법에 따라 탈세포화하고, 네개 (4)는 음압이 아닌 정상 대기압 하에 실제 동일한 탈세포화 프로토콜을 이용해 탈세포화하였다. 인간의 기관은 본 발명의 방법을 이용해 탈세포화하였다. 각 탈세포화 공정에서, 기관의 최대 길이 5 cm를 사용하였다.

[0066] 탈세포화 전체 공정은 소형 건조기 (Sigma Aldrich UK)를 사용해 수행하였다. 진공 (음압)을 구축하기 위해, 건조기에 디지탈 진공 게이지 (Pendle Refrigeration Wholesale Ltd, UK)가 부착된 Telstar Vacuum Pump 2F-10 (Pendle Refrigeration Wholesale Ltd, UK)를 연결하였다. 진공은 1500microns 수준까지 형성시켰다 (진공 게이지 1500microns은 <1KPa abs로 읽힘). 그런 후, 건조기를 프로토콜에 요구되는 온도에 따라 4℃ 또는 37℃의 교반성 인큐베이터 (100 rpm으로 설정됨)에 넣었다. 탈세포화 공정 중에 사용되는 용액들은 모두 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Sigma-Aldrich, UK)을 함유하였다.

[0067] 조직을 실온에서 1-2시간 동안 해동시킨 후, 24시간 동안 37℃에서, 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, UK), PBS 중의 0.25% 소듐 데옥시콜레이트 (Fluka)가 포함된 디터전트 용액 중에서 인큐베이션하였다. 그런 후, 조직을 행크스 평형 염 용액을 사용해 15분간 4℃ - 6℃에서 2번 헹군다. 헹군 후, 조직을 4℃ - 6℃에서 24시간 동안 행크스 평형 염 용액과 함께 인큐베이션한 다음, 2000 KU (Kunitz Units)/l DNAse (Sigma-Aldrich) 및 0.1g/l RNAse (Roche)와 함께 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하여, 핵 내용물을 용해시키고, DNA를 분해하였다. 4℃ - 6℃에서 행크스 평형 염 용액으로 추가로 (2회) 세척한 후, 기관을 24시간 동안 인큐베이션하여 4℃에서 행크스 평형 염 용액으로 세척하였다. 그런 후, 기관을 4℃ - 6℃에서 1% 항생제와 항진균제 용액이 포함된 행크스 평형 염 용액 중에 보관하거나 또는 추후 분석에 따라 가공 처리하였다. 전체 탈세포화 공정은 음압하에 수행하였고, 4-5일 소요되는데, 이는 기존의 탈세포화 기법을 이용하는 경우에 비해 실질적으로 시간이 단축된다.

[0068] *임플란트/스캐폴드 분석*

[0069] 조직학적 및 면역-조직화학적 평가: 샘플을 실오네서 10% 중성 완충화된 포르말린 용액 중에서 최소 24시간 고정하였다. 그레이드형 알코올 (graded alcohol)에서 탈수시키고, 파라핀으로 포매한 다음 5 ㎛으로 절단하였다. 단편을 헤마톡실린과 에오신 염료 (H&E), 알시안 블루, 피크로-시리우스 레드 및 밀러의 엘라스틴 염료로 염색하였다.

[0070] 면역-조직화학적 분석을 위해, 파라핀 및 동결된 단편들을 MHC I 면역-염색을 위해 테스트하였다. 포매된 5 ㎛ 파라핀 단편들을 (3-아미노프로필)트리에톡시실란 (Sigma-Aldrich UK)으로 코팅된 슬라이드 위에 두었다. 신선한 냉동된 단편을 10분간 빙랭한 아세톤으로 고정하였다. 파라핀 단편들을 탈-왁싱화하고, 자일렌을 2회 교체한 다음 알코올 농도를 줄이면서 헹군 후 차가운 수돗물로 세척하여, 재수화시켰다. 슬라이드를 습윤 챔버에 넣고, 메탄올 중의 3% 과산화수소 (Sigma-Aldrich-Uk) 를 30분간 사용해 내인성 퍼옥시다제를 차단시켰다. 파라핀 단편에서, 40분간 37℃에서 트립신을 사용해 항원 복구 (antigen retrieval)를 수행하였다. 비-특이적인 결합 부위들은 2.5% 말 혈청 (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK)을 실온에서 30분간 사용해 차단시켰다. 인간 조직 단편들을 단일클론 일차 항체 (토끼에서 생산된 항-인간 MHC 클래스 I 항체/ EP1395Y, ab52922, Abcam, UK)와 실온에서 1시간 동안 포스페이트-완충화된 염 용액 중에 1:150 희석비로 인큐베이션하였

다. 돼지 조직 단편은 포스페이트-완충화된 염 용액 중에 1:100 희석비로 4℃에서 밤새 일차 항체 (항-돼지 MHCI, H17A, VMRD Inc. Pullman USA)와 인큐베이션하였다.

[0071] PBS로 3 x 3분 세척한 후, 단편을 실온에서 30분간 이차 항체 (Impress 항-마우스 또는 Impress 항-토끼 면역글로불린 G/ 퍼옥시다제 키트, Vector Laboratories)와 인큐베이션하였다. 다시 PBS로 3 x 3분 세척한 후, 발색단 기질 다이아미노벤지딘 (Impact 퍼옥시다제 기질, Vector Laboratories)을 실온에서 3분간 단편에 적용하였다. 단편을 세척한 후, 해리스의 헤마톡실린에서 30초간 대조염색한 후, 탈수, 클리어닝한 다음 커버 슬립을 덮었다. 음성 대조군의 경우, 동일한 프로토콜을 사용하였지만, 일차 항체는 생략하였고, 포스페이트-완충화된 염 용액을 사용하였다. 양성 대조군으로서 돼지 또는 인간 비장을 사용하였다.

[0072] *주사 전자 현미경 (SEM)*

[0073] 탈세포화된 매트릭스 구조를 정성적으로 평가하기 위해, 조직 샘플을 0.1M 포스페이트 완충제 중의 3% (v/v) 글루타르알데하이드 (Sigma-Aldrich)로 고정하였다.

[0074] 그런 후, 단편들을 증류수로 세척한 후, 에탄올 농도 구배로 탈수시킨 후, 임계점에서 건조시켰다. 그런 후, 표본을 주사 전자 현미경 스텁에 고정된 양면 접착 테이프 위에 두고, 금 합금으로 코팅하고, 사진을 촬영하였다.

[0075] *분자 분석*

[0076] DNA 분석: DNA를 추출하고 정량하기 위해, GenElute 포유류 게놈 DNA 미니프렙 키트 (Sigma-Aldrich-UK)를 제조사의 설명서에 따라 사용하였다. 간략하게는, 생 조직 또는 탈세포화된 기관 조직 (인간 및 돼지)의 저민 젖은 조직 25mg을 프로테나제 K와 함께 마이크로-원심분리관에 넣고, 30분 간격으로 볼텍싱하면서 4시간 동안 55℃에서 수조 안에서 인큐베이션하였다. 눈으로 완전한 소화를 확인한 다음, 샘플을 2분간 실온에서 리보뉴클레아제 A 용액과 접촉시켰다. 샘플을 DNA 추출 분석 키트의 세포용혈 시약과 함께 10분간 70℃에서 인큐베이션하였다. 세포용혈물을 DNA 결합용 준비된 컬럼에 주입하였다. 여러번 세척 단계를 수행하여 불순물들을 제거한 다음, 마지막으로 DNA를 트리스-에틸렌다이아민테트라아세트산 용액 200 ㎕에 희석하였다. 자가-마스킹 석영 마이크로큐벳과 분광광도계 (Helios Alpha, Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK)를 이용해 260nm 및 280nm에서 흡광도를 측정하고, 조직 mg 당 DNA 절대량을 계산하였다.

[0077] DNA를 0.8% 아가로스 겔 전기영동을 수행하여, 추출된 DNA의 크기, 특성 및 순도를 확인하였다. 0.8% 아가로스 겔은 전극 간의 4 - 5 V/cm에서 0.5X 트리스-보레이트-에틸렌다이아민테트라아세트산 완충제 중에서 운영하였다. 각 웰에는 DNA (2㎕)를 동일 부피로 부하하였다. 에티듐 브로마이드로 염색하여 가시화하고, 자외선을 투과하여 1-kb DNA ladder (Q-Step 4 quantitative DNA ladder, Yorkshire Bioscience Ltd., York, UK)로 DNA를 측정하였다.

[0078] GAG 정량: Blyscan GAG 분석 키트 (Biocolor)를 사용해, 인간 및 돼지의 신선한 기관 샘플과 탈세포화된 기관 샘플내 황산화 글리코스미노글리탄 (sGAG) 함량을 정량하였다. 간략하게는, 저민 젖은 조직 50mg을 마이크로-원심분리관에 넣고, 파파인 소화 완충제 1 ml과 함께 65℃에서 18시간 인큐베이션하였다. 각 샘플의 분액을 1,9-다이메틸-메틸렌 블루 염료 및 GAG 분석 키트의 시약과 혼합하였다. 분광광도계로 656nm에서 흡광도를 측정하고, 소의 기관 콘드로이틴-4-설페이트로부터 구해진 표준 곡선과 비교하여 GAG 절대량을 계산하였다.

[0079] 콜라겐 정량: 인간 및 돼지의 신선한 기관과 탈세포화된 기관 샘플에서 콜라겐 함량을 Sircol 콜라겐 분석 키트 (Biocolor, Carrickfergus, Northern Ireland)로 정량하였다. 간략하게는, 저민 젖은 조직 50mg을 마이크로-원심분리관에 산-펩신 추출 매질 (0.5mol/l 아세트산 중의 0.1mg/ml 펩신) 1.5 ml과 함께 넣었다. 각 샘플의 분액을 산-중화제 및 콜라겐 분리 시약과 함께 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다. 그런 후, 샘플을 콜라겐 분석 키트의 sirius 레드 염료에 노출시켰다. 분광광도계로 555nm에서 흡광도를 측정하였다. 1형 소 피부 콜라겐으로 작성된 표준 곡선과 비교하여, 콜라겐의 절대량을 계산하였다.

[0080] *생체역학 검사*

[0081] 표본에 대해 조직에서 하중 감소 및 균열 출현에 의해 검증되는 실패할 때까지 한축으로 신장시켰다. 공정은 도 10에 계략적으로 도시된다.

[0082] 각 검사에서, 하나의 개방형 기관 링 (돼지 또는 인간, 신선한 샘플 또는 탈세포화된 샘플)을 사용하였다. 기관 표본 (2)을 열어, 최장 길이가 33 mm인 편평한 사각형 조각을 만들어, 홀더 (8, 8')에 고정된 클램프 (6, 6')로 클랭핑하고, 일정한 신장 속도 100 mm/min 및 최대 힘 500N를 부하하였다. 검사는 실온에서 Instron In-

Spec 2200 Benchtop Portable Tester를 사용해 일축 신장하면서 수행하였다.

[0083] 신장 테스터로 실시간으로 조직에 가해지는 하중과 연장을 기록하였다. 최대 힘 (N), 파열 힘 (N), 최대 하중에서의 연장 (cm)과 같은 파라미터를 기록하였다. 응력-변형 비율 (영률 (Young's modulus))을 계산하였고, 이는 탄성 물질의 강성 (stiffness)의 척도이다.

[0084] 탈세포화된 스캐폴드의 생체적합성

[0085] 모든 외과적 및 동물적 처치는 동물 (과학 절차) 법률 1986 및 내무성 사용 규정에 따라 수행하였다. 관련 윤리적 승인을 신청하여 노스윅 파크 의학 연구 기관으로부터 승인을 받았다.

[0086] 이식하기 전에, 각 스캐폴드를 UV 살균으로 추가로 살균하고; 샘플을 2x20 분 동안 UV 광에 노출시켰다. 스프레그-다룰리 랫 총 6마리를 사용하였다. 전신 마취 하에 방부 처리 기법을 이용해, 복벽에 중심선 절개를 행하고, 중심선 양쪽에 피부와 근육 사이에 소형 포켓을 형성하였다. 그런 후, 각 포켓에 1cm x 1cm의 탈세포화되거나 또는 비-탈세포화된 기관 조직을 수용시켰다. 2주 후, 펜토바르비탈을 취사량으로 사용해 각 동물을 희생시켰다. 이식된 조직을 외식하고, 조직학적 평가를 위해 가공하였다.

[0087] 통계학적 분석

[0088] 데이타는 평균 ± 표준 오차로 계산하였고, 2-측 스튜던트의 t-검정 (2-tailed Student's t-test)과 오디너리 일원식 ANOVA 및 사후 검증으로서 본페로니 (Bonferroni)를 수행하여, 유의성을 결정하였다 (Prism 6: Graphpad Software, La Jolla, California). p 값 0.05 미만은 유의한 것으로 간주되었다.

[0089] 결과

[0090] 돼지 11마리와 인간 공여자 2명으로부터 기관 조직을 회수하여, 본 발명에 따른 탈세포화 (이하, "DC") 공정으로 처리하였다.

[0091] *DNA 분석:*

[0092] 탈세포화 후, 거시적으로 조직은 무색으로, 아마도 적혈구 세포의 제거로 인해 무색으로 보인다 (도 1 참조).

[0093] 용액이 조직으로 침투되는 것을 보조하기 위해 돼지 기관을 진공을 가하면서, 그리고 진공을 가하지 않으면서 탈세포화하였다. 조직학적 H&E 염색된 슬라이드에서, 본 발명에 따른 방법인, 진공 적용된 탈세포화가 가해진 조직에서 내강 상피 (점막), 점막하 샘, 기관근 및 바깥쪽 외막 안에 온전한 핵들이 모두 완전히 소거되었다. 연골에서, 모든 연골 세포들이 소강 안에서 효과적으로 제거되었다. 그러나, 진공-보조된 탈세포화를 거치지 않은 조직은 전부는 아니지만 약간 소강 안에 온전한 연골 세포가 존재하는 것으로 나타났다 (도 2). 이러한 결과는, 대조군 조직과 비교해, 진공 적용된 및 진공 비-적용된 탈세포화 후, 상당한 DNA의 양적 감소가 나타낸 분자 DNA 정량화에 의해 뒷받침되었다. 아울러, DNA의 비-유의한 감소가 비-진공 및 진공-보조된 프로토콜 간에 관찰되었다 (도 3: 대조군 n=7, 300.4±27.05 ng/mg vs. DC no-vac: n=3, 109.8 ±37.45 ng/mg vs. DC vac n=6, 36.14±7.834 ng/mg, $p<0.05$.).

[0094] 진공 탈세포화를 모두 거친 인간 기관들은 조직학적으로 (도 4) 및 분자 DNA 분석 측면에서 조직 전체에 모든 핵 물질의 완전한 소거를 나타내었다 (대조군 n=2, 304.4±8.268 ng/mg vs. DC n=7, 50.04±6.003 ng/mg, $p<0.05$, 도 3 참조). 도 15는 또한 모든 DNA의 실질적인 소거를 보여준다.

[0095] *콜라겐 평가*

[0096] 양쪽 종으로부터 수득한 조직에 대한 피크로-시리우스 레드와 뮐러 엘라스틴에 의한 평가 결과, 연골과 콜라겐의 양호한 보존성과 형태가 확인되었다 (도 5, A-D). 아울러, 소형 세동맥 및 세정맥 안의 미세 엘라스틴도 보존되었다 (도 5, E-H). 단편을 편광 하에 검경하였을 때 (도 5, I-L), 모든 콜라겐을 복굴절하여, 브라이트 레드-오렌지-옐로우 색은 콜라겐의 양호한 구조적 완전성을 의미한다.

[0097] 콜라겐 분해에 대한 분자적 분석과 관련해, 대조군 및 비-진공 가공된 돼지 샘플들 간에 현저한 차이가 있었다. 돼지 대조군과 본 발명의 방법에 의해 제조된 샘플들 간에도 콜라겐 분해에 차이가 없었으며, 본 발명에 따라 제조된 인간 탈세포화된 조직과 대조군 조직 간에도 어떠한 차이가 없었다 (돼지: 대조군 n=9, 27.8±8.829 μg/mg, DC: no-vac n=2, 6.774±0.067 μg/mg, DC vac: n=49, 23.03±3.897 μg/mg, 인간: 대조군 n=3, 12.86±3.657 μg/mg, DC n=9, 8.186±2.322 μg/mg, 도 6 참조).

[0098] 콜라겐 초미세-구조도 SEM으로 분석하였으며, 본 발명에 따라 제조된 돼지 탈세포화된 조직 안의 콜라겐 섬유들

이 대조군 돼지 조직에서 보다 더 느슨하게 결합된 것으로 나타났다. 유사한 외양은 인간 조직에서도 나타났다 (도 7).

[0099] *스캐폴드 GAG 평가*

[0100] 양쪽 종으로부터 유래된 탈세포화된 스캐폴드에 유지되는 GAG의 양 평가를 알시안 블루 조직학적 염색 (도 8)과 정량적인 분자 테스팅을 이용해 평가하였다. 반면, 돼지 스캐폴드는 진공이 수반된 경우와 수반되지 않은 탈세포화 공정 중에 자신의 GAG의 70% 이상을 소실하는 반면 (대조군 n=14, 488.3±75.61 ng/mg vs. DC no vacuum n=10, 59.12±11.54 ng/mg vs. DC vacuum n=8, 47.37±3.921, $p<0.05$), 인간 조직에서는 큰 차이가 없었다 (대조군 n=2, 44.03±0.89 vs. DC/ n=7, 57.64±3.12)

[0101] *생체역학*

[0102] 대조군 및 탈세포화된 (오직 본 발명에 따라 제조됨) 샘플에 대한 생체역학 분석을 도 10에 도시한 바와 같이 양쪽 종에서 실시하였다. 하나의 연골질 링 (2)을 취하고, 이를 절단하여 연 다음 막성부 (pars membranacea)를 제거하여 균일한 사각형 조직 조각을 수득하였으며 (4), 이를 샘플 홀더 (8. 8')에서 샌드 페이퍼 사이에 클램핑하였다. 인장 세기, 파열힘, 파단시 연장 및 영률과 같은 임의의 파라미터에서는 유의한 차이가 없었으며, 각 데이타를 표 1에 나타낸다.

표 1

[0103]

	돼지 대조군 (n=12)	돼지 DC (n=5)	유의성	인간 대조군 (n=2)	인간 DC (n=3)	유의성
인장 세기 (kPa)	3326 +/- 292.4	3022 +/- 404.7	ns (p=0.4494)	1240 +/- 754.8	1503 +/- 808.9	ns (p=0.4743)
파열 힘 (N)	33.26 +/- 2.924	30.22 +/- 4.047	ns (p=0.4494)	1240 +/- 7.548	15.03 +/- 8.089	ns (p=0.4743)
파단시 연장 (%)	79.34 +/- 5.804	68.57 +/- 3.805	ns (p=0.0555)	43.28 +/- 22.17	48.48 +/- 5.696	ns (p=0.0864)
영률 (kPa)	4587 +/- 615.9	4382 +/- 462.0	ns (p=0.0868)	5096 +/- 4354	3441 +/- 1977	ns (p=0.2140)

[0104] 표 1: 돼지 및 인간으로부터 유래된 대조군과 (본 발명의 방법을 이용해) 탈세포화한 기관 조직에 대해 인장 세기, 파열 힘, 파단시 연장 및 영률을 비교한 생체역학 검사의 결과

[0105] *생체적합성*

[0106] 생체내 생체적합성 연구를 수행하기 전에, 양쪽 종으로부터 유래된 탈세포화된 샘플을 IHC로 염색하여, 이들 세포가 이식되었을 때 숙주로부터 잠재적인 면역 반응을 유발할 수 있는지를 분석하였다. 샘플을 MHC I/HLA-1에 대해 염색하였다. MHC가 염색된 섹션들은 양쪽 종들에서 근막(facia)/외막(adventitia)이 중첩된 곳에서 양성을 나타내었다. 연골질 링에서는 염색이 거의 또는 전혀 확인되지 않았다 (도 11). MHC1/HLA-1에 대해 염색한 인간 단편들에서는 연골, 콜라겐 또는 중첩되는 근막에서 양성이 확인되지 않았다 (도 11).

[0107] 탈세포화된 기관의 작은 조각을 랫에게 피하 이식하여 2주간 두었다. 외식 (도 12)시, 각 이식된 샘플을 여전히 알 수 있었다. 이식된 DC 인간 기관으로부터 유래된 모든 조직 단편들은 마이너 염증 반응을 나타내었다 - 도 13에 나타낸 바와 같이, 급성이며, 약간 만성 (호중구, 호산구가 몇개 있으며, 보통 수준의 대식 세포 및 때때로 림프구의 합포체 존재). 아울러, 도 14에 나타낸 바와 같이, 신형성생성 및 통합 (integration)이 양호하였고, 세포외 기질이 온전한 것으로 확인되었다.

[0108] 실시예 2

[0109] *본 발명에 따른 탈세포화된 뼈 및 힘줄 스캐폴드 및 대조군의 제조*

[0110] 관련성 없는 실험들에서 희생된 돼지에서 조직 샘플을 입수하였다. 돼지는 모두 암컷으로, 약 5월령, 무게가 50 kg이었다. 뼈 샘플은 돼지의 종골로부터 수득하였다. 힘줄 샘플은 장지굴근 힘줄에서 수득하였다. 이들 샘플은 검시 후 수득하여, 프로토콜에 따라 사용하기 전까지 플라스틱 샘플 백에 넣어 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

[0111] 뼈 및 힘줄 임플란트를 제조하기 위해, 기관 임플란트 제조에 대해 상기 기술된 프로토콜과 유사한 프로토콜을 수행하였으며, SDS, TnBP (트리-n-부틸 포스페이트), Triton X-100, DNAse 및 RNAse를 탈세포화제로서 이용해 음압 조건 하에 수행하였다. 또한 음압을 적용하지 않고 탈세포화제를 관류시킨 뼈 및 힘줄 대조군 샘플도 사용하였고, 수득한 조직을 조직학적으로 분석하였다.

[0112] 사용한 프로토콜은 아래 표 2에 나타내며, 모든 단계들은 본 발명의 방법을 이용해 관류된 조직에 대해 0.2kPa의 음압 하에 수행하거나, 또는 대조군 조직 샘플의 경우에는 주위 압력을 적용하여 수행하였다. 표 2에 나타낸 각 단계들 사이에, 15분의 세척 단계를 탈이온수를 사용해 3회 수행하였다.

표 2

[0113]

단계	용액	pH	온도(℃)	시간 (Hour)
1.	저장성 10mM 트리즈마 베이스, 0.4mM PMSF (1ml 에탄올에 용해됨), 5mM EDTA	8.5	20	24 또는 36
2.	고장성 1.5M 염화 칼륨, 50mM 트리즈마 베이스, 1% (v/v) triton x-100, 0.4mM PMSF	8.0	20	48
3.	탈이온수	7.0	37	24
4.	PBS, DNase, 0.04mgml^{-1} RNase	7.6	37	5
5.	50mM 트리즈마 베이스 + 1% (w/v) SDS 또는 1% (v/v) TnBP (트리-n-부틸 포스페이트)	8.0		72 120 168 216 및 264
6.	50mM 트리즈마 베이스	9.0	20	24
7.	PBS	8.0	20	24

[0114] 표 2 - 뼈 및 힘줄 조직 샘플에 대한 탈세포화 프로토콜의 단계들

[0115] 탈세포화한 후, 임의의 핵 물질이 남아있는지를 확인하기 위해 헤마톡실린 및 에어신 (H&E) 염색을 수행하였다. ECM에서 콜라겐 섬유와 엘라스틴 섬유의 상태를 확인하기 위해, Picro-Sirius Red 및 뮐러의 엘라스틴 (P&M) 염색을 수행하였다. 대표적인 사진을 광 현미경에서 x40 및 x200 배율에서 모든 샘플에 대해 촬영하였다. 모든 P&M 슬라이드를 비-편광 및 편광을 통해 사진을 촬영하여, 콜라겐 섬유와 엘라스틴 섬유의 상태를 부각할 수 있게 하였다. 도 16 & 17는 본 발명에 따라 제조된 힘줄 조직 (도 16) 및 대조군 힘줄 조직 (도 17)의 H&E 염색 결과를 보여준다. 도 18은 본 발명에 따른 골 조직에 대한 H&E 염색 결과를 보여준다.

[0116] 힘줄 조직으로부터 핵 물질이 제거된 완전한 탈세포화는 본 발명에 따른 음압 조건 (도 16)하에 달성된 반면, 주위 압력 하에 제조된 대조군 힘줄 샘플에서는 핵 물질을 여전히 볼 수 있었다 (도 17). 마찬가지로, 본 발명에 따라 음압 하 탈세포화로 제조된 뼈 조직 샘플에는 도 18의 H&E 염색 샘플에서 확인되는 바와 같이 실질적으로 핵 물질이 존재하지 않는 것으로 확인되었고, 소강이 빈 것을 볼 수 있었다.

[0117] 실시예 3

[0118] *본 발명에 따른 탈세포화된 후두의 제조*

[0119] 조직 샘플을 인간 사체로부터 입수하여, 플라스틱 백에 넣어 -20℃에 보관하였다.

[0120] 실시예 1에 기술된 바와 유사한 프로토콜을 후두 샘플에 대해 수행하였으며, 탈세포화제로서 DNAse, RNAse, Triton X-100 및 소듐 데옥시콜레이트 (SOC)를 이용하였다. 본 방법의 모든 단계들은 실시예 1에 기술된 바와 같이 건조기와 Telstar Vacuum Pump 2F-10을 1500 micron으로 사용하여 <1kPa 음압 조건 하에 수행하였다.

[0121] 프로토콜의 구성 성분은 아래에 기술되며, 프로토콜은 하기 표 3에 나타낸다:

[0122] 용액 준비

[0123] 라트룬쿨린 (latrunculin) B (Lat B) 분말 형태 - 1mg Lat B 395,51g/mol.

[0124] 여기에, 100 μM 스톡 용액으로 준비된 글루코스-고함유 DMEM 25 ml을 첨가하고, 1 ml 관에 25개 분주하여, -20℃ 냉동고에 보관하였다.

[0125] 1. 글루코스-고함유 DMEM (4500mg 글루코스) 중의 50nM 라트룬쿨린 B (Lat B) - Lat B 50 ㎕/글루코스-고함유

DMEM (Dulbecco's Modied Eagle Medium) 100ml.

[0126] 2. 0.25% Triton X & 0.25% SOC - PBS 1 L에 소듐 데옥시콜레이트 용액 (SOC) 2.5g과 Triton X 2.5ml을 첨가하였다

[0127] 3. PBS - PBS 정제 5개를 탈이온수 1 L에 첨가하였다

[0128] 4. 칼슘과 마그네슘이 첨가된 행크스 평형 염 용액 - Sigma Aldrich H6648.

[0129] 5. 0.6M 포타슘 클로라이드 (KCl) - PBS 1 L에 KCl 44.73g을 첨가하였다

[0130] 6. 1M 포타슘 아이오다이드 (KI) - PBS 1 L에 KI 166g을 첨가하였다

[0131] 7. 인큐베이션 완충액 - PBS 1 L에 첨가함 - 마그네슘 클로라이드 ($MgCl_2$) 0.5g, 칼슘 클로라이드 ($CaCl_2$) 0.055g, DNAse는 사용 직전에 인큐베이션 완충액에 필요한 부피로 첨가하였다.

[0132] 8. DNAse - 효소 2000ku가 든 DNAse 바이얼 1개를 탈이온수 1 L에 혼합하였다. 물 5 ml을 DNAse 바이얼에 넣고, 1 ml 에텐도르프 튜브 5개에 분주하였다. 조제된 효소 용액 1 ml은 인큐베이션 완충액 200 ml에 사용하였다.

[0133] 9. RNAse - 인큐베이션 완충액 100 ml을 RNAse 0.01 g과 혼합하였다.

표 3

[0134] 표 3

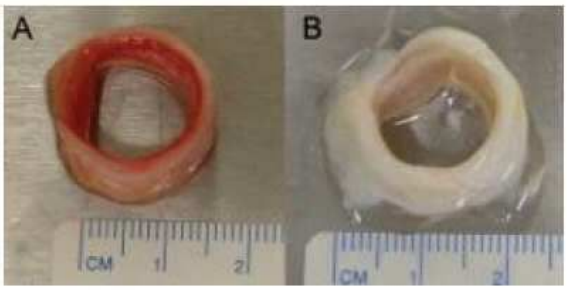
공정	시약	시간	음압 하에 수행되는 단계	온도 (℃)
1	라트룬큘린 B	2h	√	37
2	행크스 평형 염 용액 (HBSS)	2x 15min	√	RT
3	KCL	2h	√	RT
4	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
5	KI	2h	√	RT
6	행크스 평형 염 용액	밤새	√	RT
7	KCL	2h	√	RT
8	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
9	KI	2h	√	RT
10	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
11	DNAse/ RNAse	2h	√	37
12	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
13	동결	12h +/-4h	√	-20
14	해동	12h +/-4h	√	RT
15	Triton/ SOC	24h	√	RT
16	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
17	DNAse/ RNAse	24h +/-4h	√	37
18	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
19	Triton/ SOC	1h	√	RT
20	행크스 평형 염 용액	2x 15min	√	RT
21	행크스 평형 염 용액	48-72hr	√	4

[0135] 프로토콜에 따른 결과로 완전한 탈세포화와 핵 물질 제거가 달성된 탈세포화된 후두 조직이 만들어졌다.

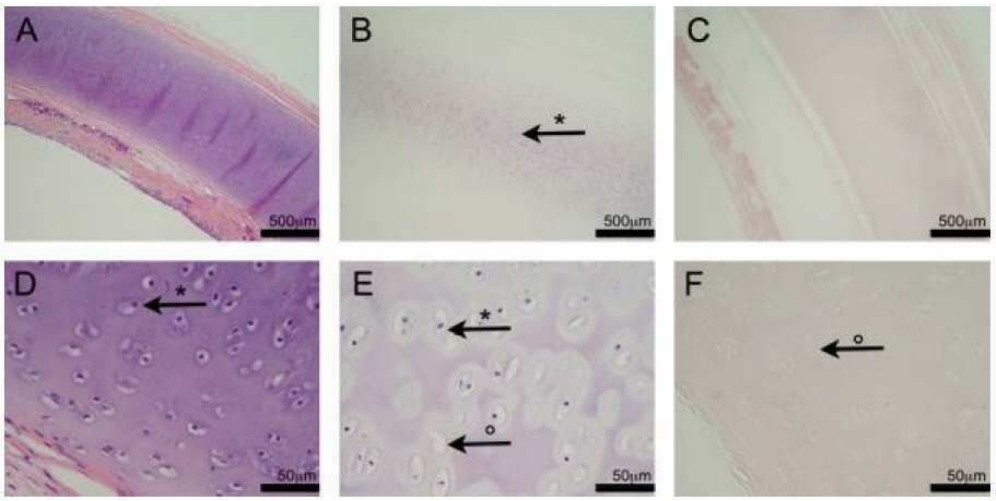
[0136] 전술한 구현예들은 단지 예로서 기술된 것이다. 첨부된 청구항으로 정의된 본 발명의 범위내에서 수많은 변형이 이루어질 수 있다.

도면

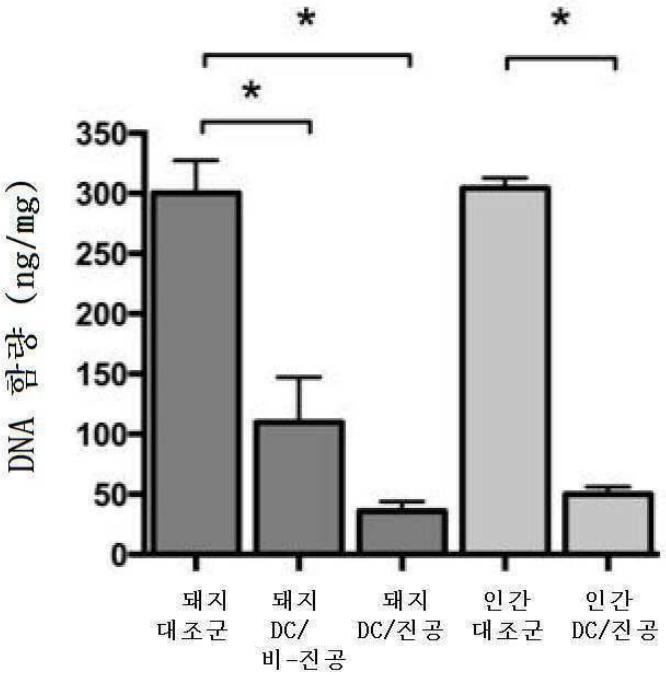
도면1



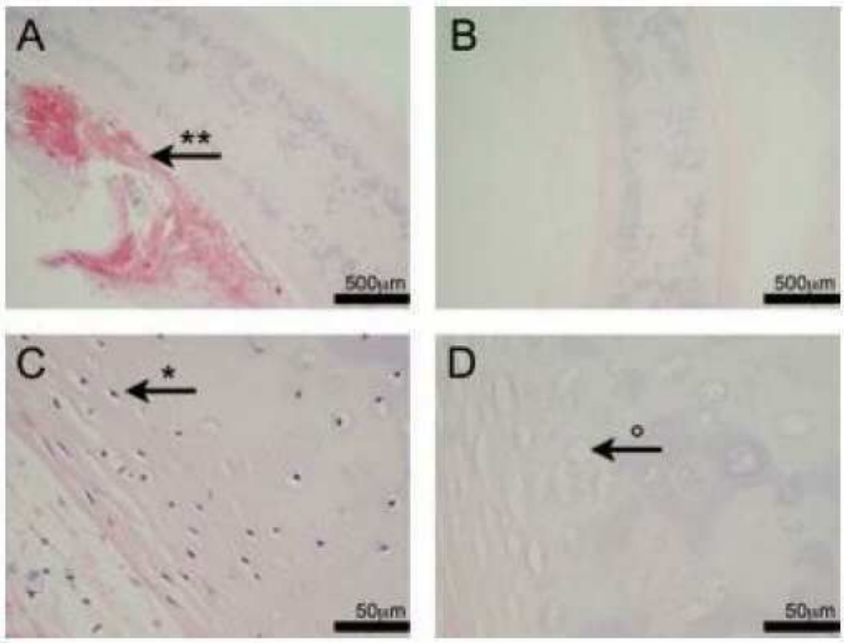
도면2



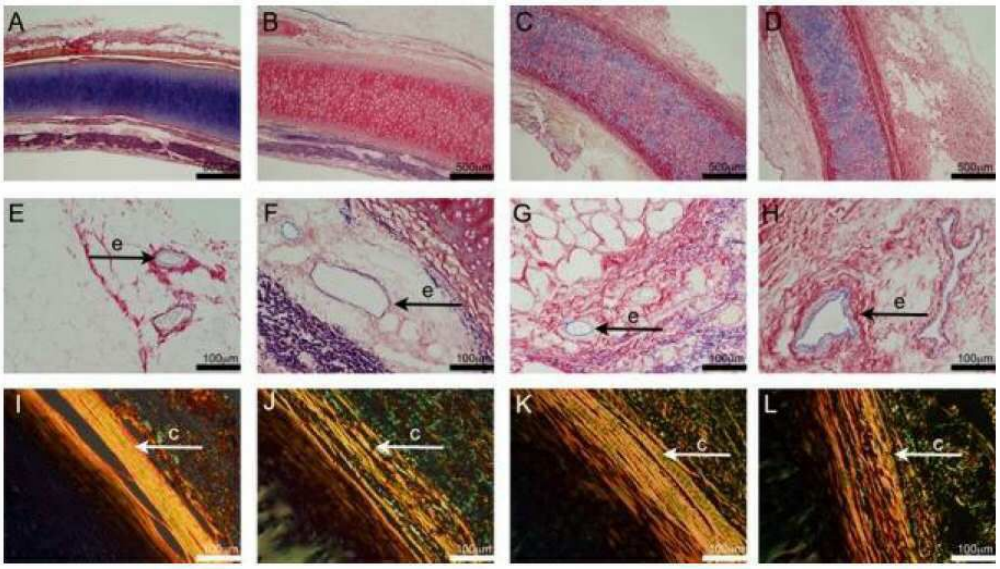
도면3


*
*
*
DNA 함량 (ng/mg)
350
300
250
200
150
100
50
0
돼지 대조군
돼지 DC/ 비-진공
돼지 DC/진공
인간 대조군
인간 DC/진공

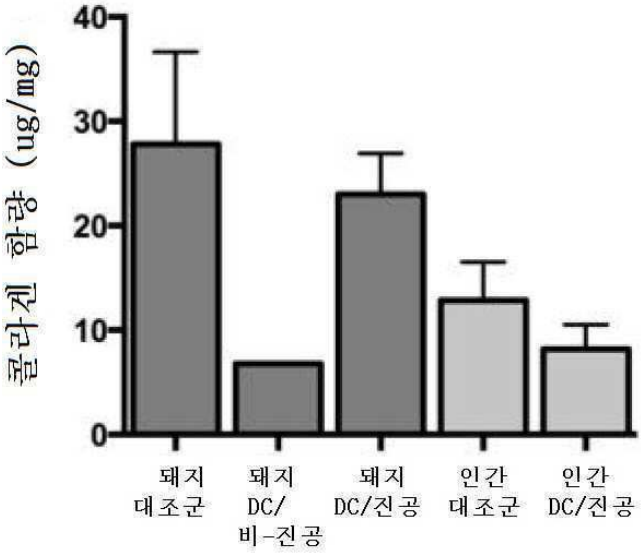
도면4


A
**
500μm
B
500μm
C
*
50μm
D
°
50μm

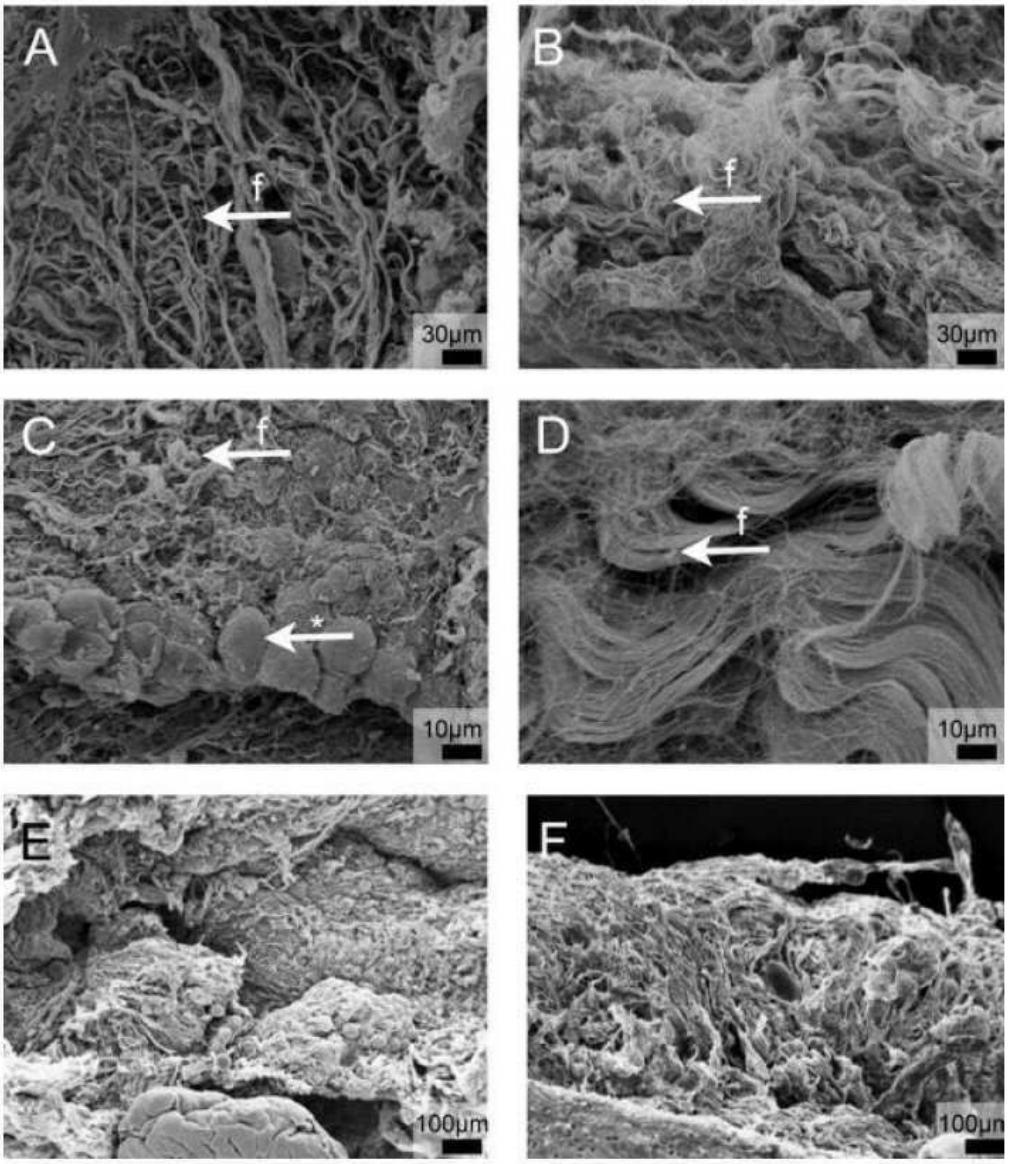
도면5


A
B
C
D
E
e
F
e
G
e
H
e
I
c
J
c
K
c
L
c

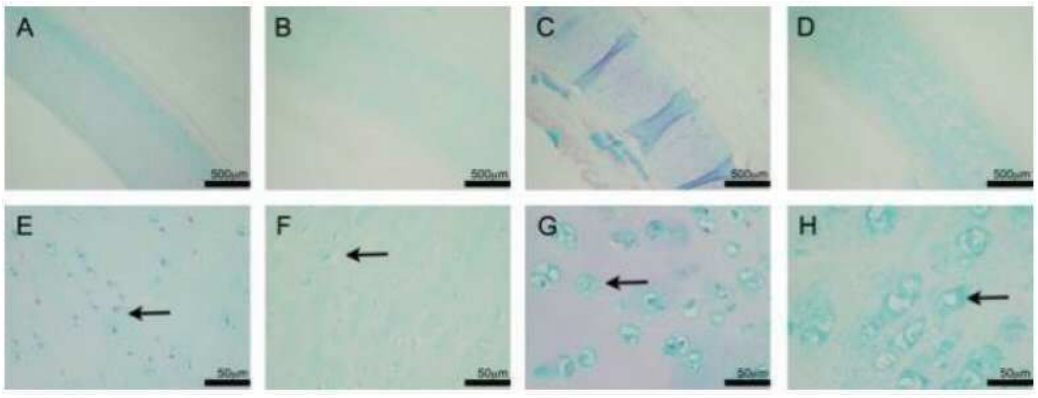
도면6


콜라겐 함량 (ug/mg)
40
30
20
10
0
돼지 대조군
돼지 DC/비-진공
돼지 DC/진공
인간 대조군
인간 DC/진공

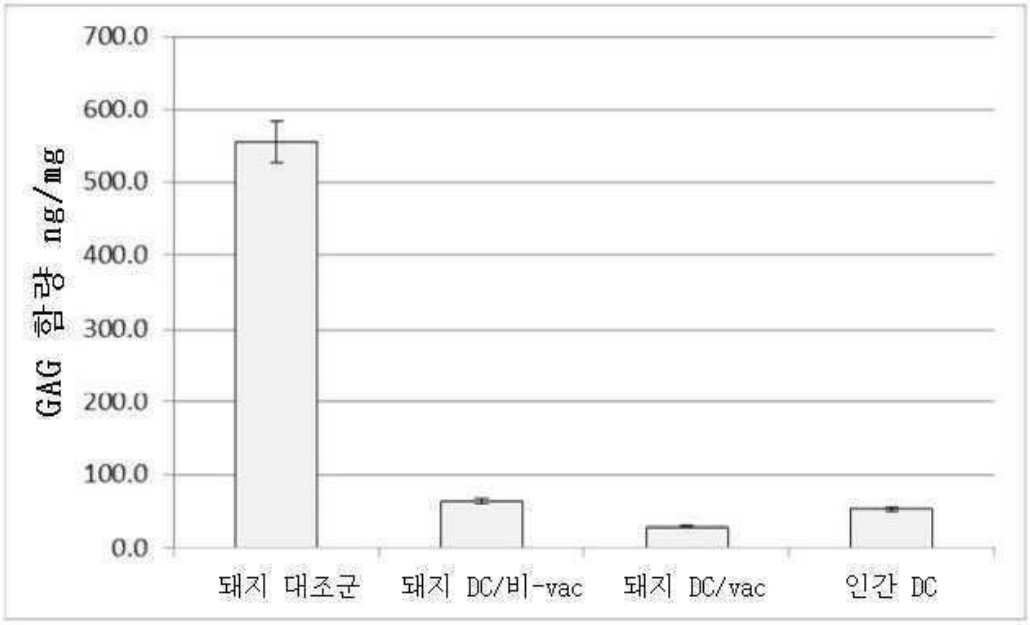
도면7



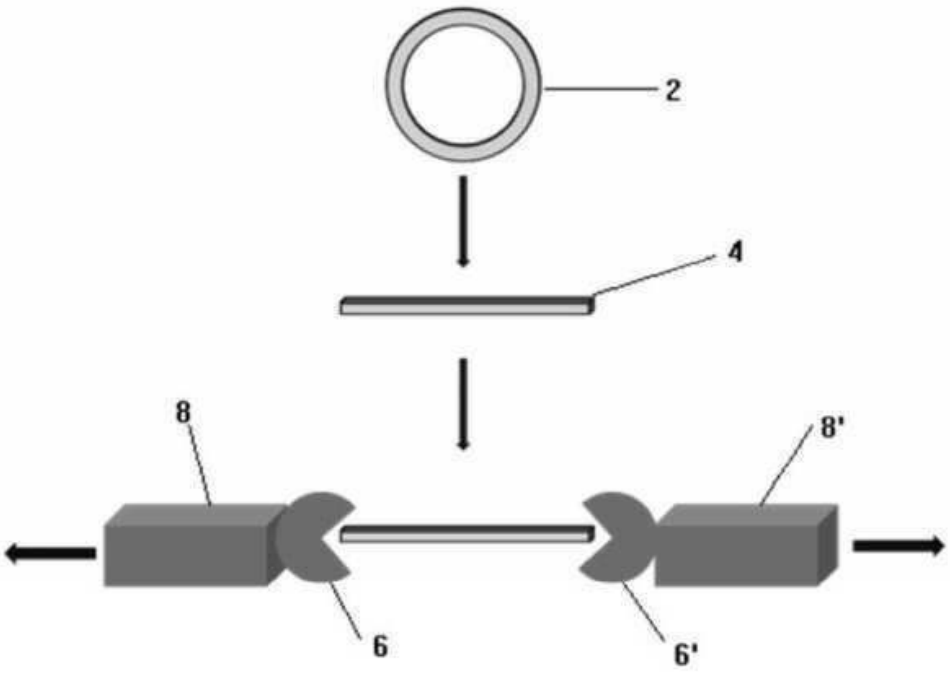
도면8



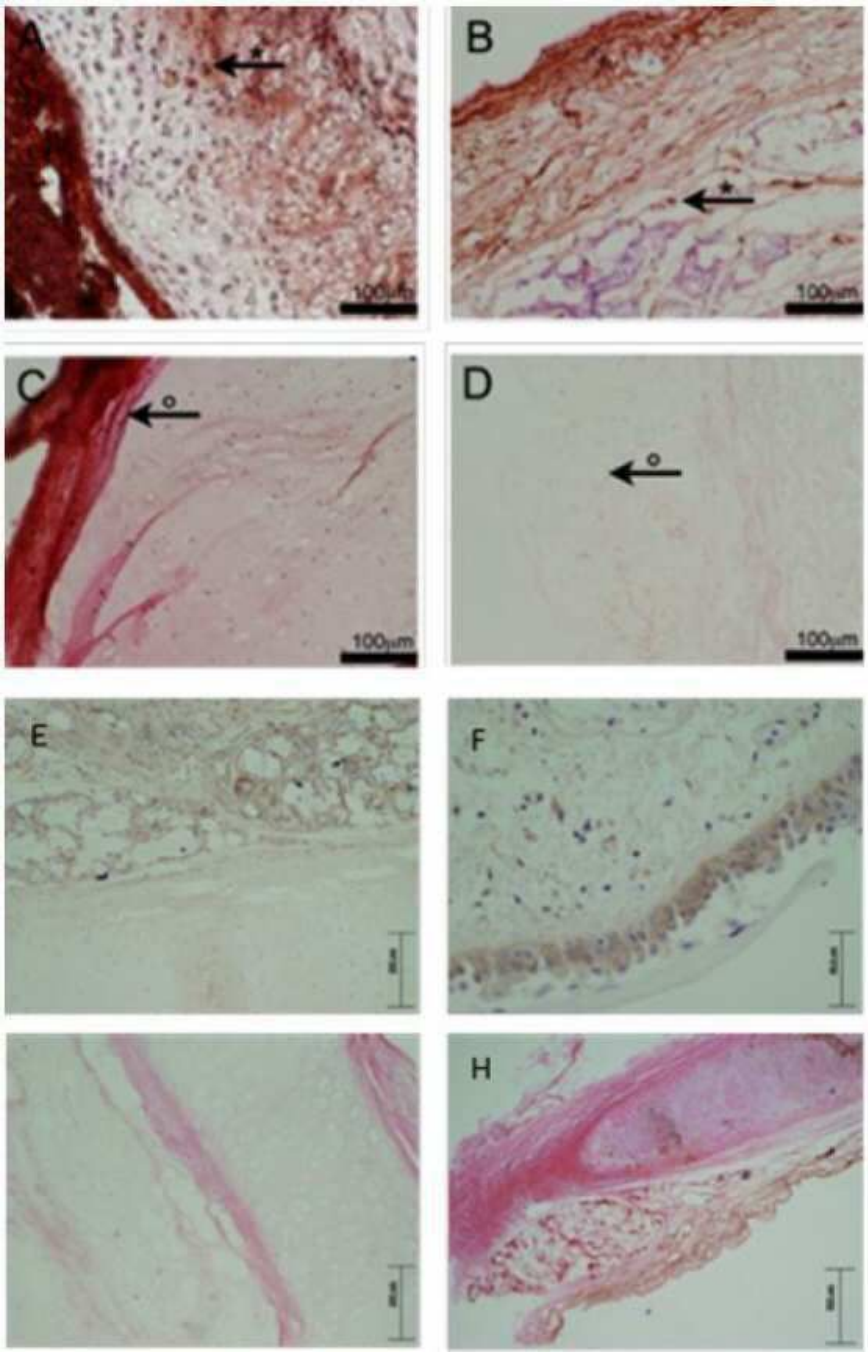
도면9


700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
GAG 함량 ng/mg
돼지 대조군
돼지 DC/비-vac
돼지 DC/vac
인간 DC

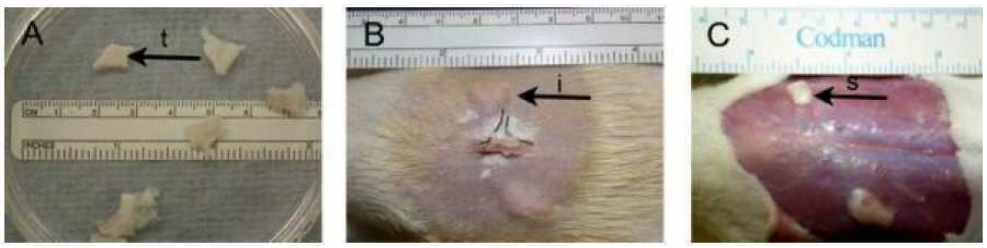
도면10


2
4
8
8'
6
6'

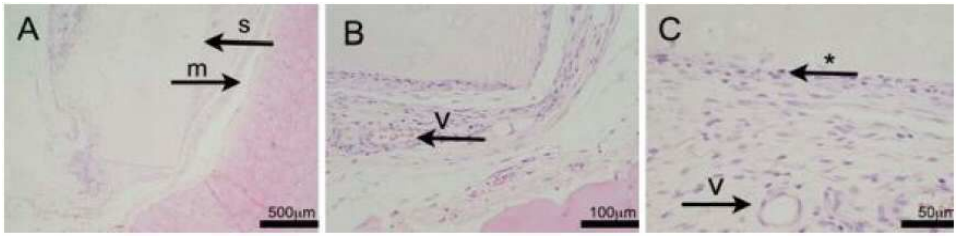
도면11



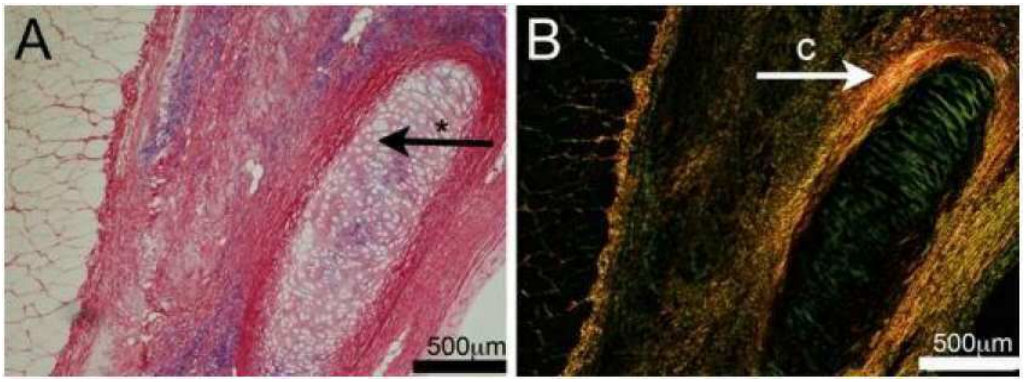
도면12



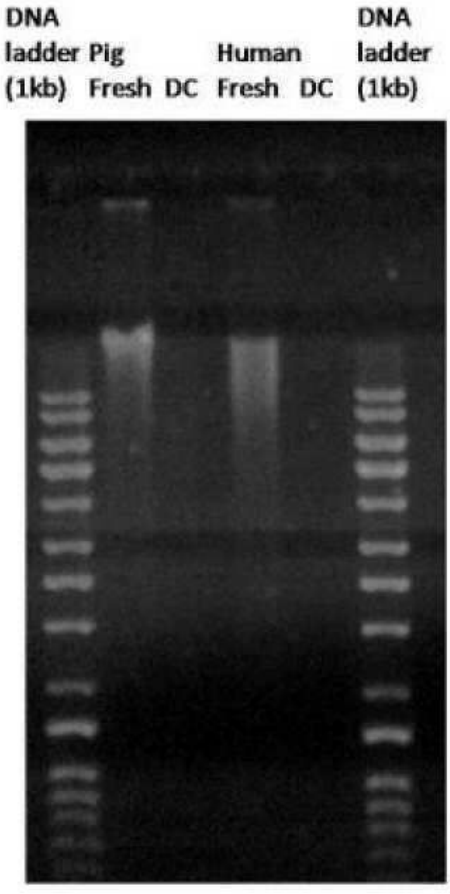
도면13



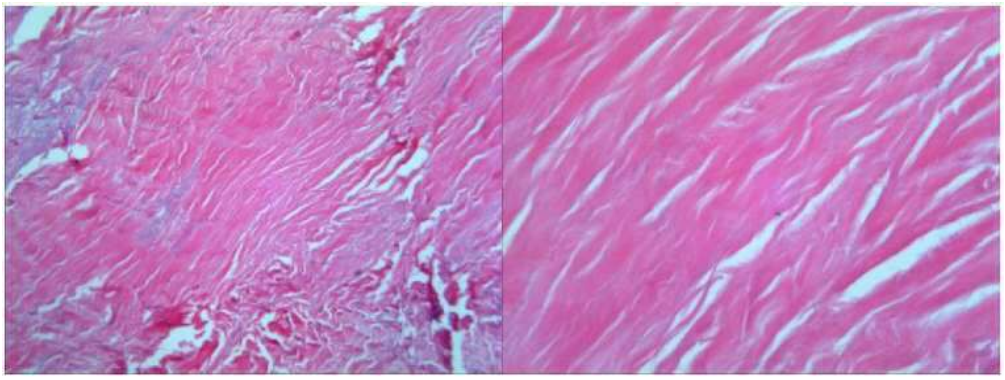
도면14



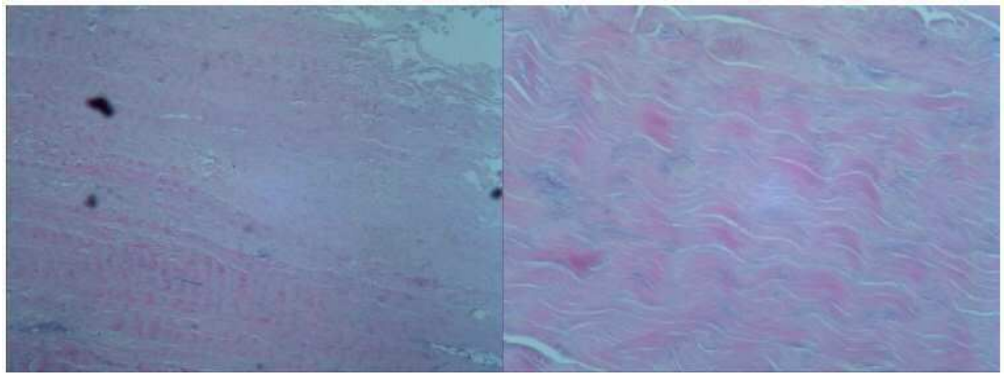
도면15



도면16



도면17



도면18

