

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 5/00(11) 공개번호 특2000-0057136
(43) 공개일자 2000년09월15일

(21) 출원번호 10-1999-7004403
 (22) 출원일자 1999년05월19일
 번역문제출일자 1999년05월19일
 (86) 국제출원번호 PCT/US1997/21088 (87) 국제공개번호 WO 1998/22573
 (86) 국제출원출원일자 1997년11월18일 (87) 국제공개일자 1998년05월28일
 (81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나
 징바브웨
 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐
 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스
 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투
 칼 스웨덴 핀란드
 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카
 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고
 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트레일리아 아제르바이잔
 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다
 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드
 일본 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라
 이베리아 리투아니아 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고
 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크
 메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우즈베키스탄 베트남
 폴란드 루마니아 러시아 싱가포르 인도네시아 시에라리온 가나 유고
 슬라비아

(30) 우선권주장 8/753, 104 1996년11월20일 미국(US)
 (71) 출원인 어드밴스드 티슈 사이언스, 인코퍼레이티드 나우톤 질 케이.
 미국, 캘리포니아 92037-1005, 라 졸라, 노스 토레이 파인스로드10933
 (72) 발명자 셀릭타, 드를
 미국30339조지아주애틴랜타페이시즈스테이션릿지3181
 둔켈만, 노우신
 미국92131캘리포니아주샌디에고메사마데라코트11518
 피터슨, 앨빈, 이.
 미국91935캘리포니아주자무엘스카이라인트럭테라스17620
 슈라이버, 론다, 이.
 미국92065캘리포니아주라모나캐린코트25745
 월로우비, 제인
 미국92014캘리포니아주델마노브애비뉴13731
 노튼, 게일, 케이.
 미국92014캘리포니아주델마레네타드라이브1280
 (74) 대리인 장수길, 김영

심사청구 : 없음(54) 연골세포에 전단류 응력의 인가요약

인공 연골의 생성에 사용되는 배양된 포유 동물의 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm²의 전단류 응력을 가하기 위한 생반응기 및 방법이 제공된다. 이 생반응기는 배지 저장기 (9), 펌프 (10), 단층 지지 표면 또는 3차원 지지대와 같은 기질을 함유하는 성장 챔버 (11), 및 관 (12)를 함유하는 순환류 시스템 (16)일 수 있다. 전단류 응력은 액체 성장 배지 중에 잠겨진 회전 드럼 또는 회전 원반의 표면 상에 연골세포 단층을 성장시키거나, 액체 성장 배지가 펌핑되어 통과하는 정지판 상에 연골세포 단층을 성장시키거나 또는 3차원 지지대 중에 연골세포를 형성시키고 지지대를 통해 액체 성장 배지를 통과시킴으로써 가한

다. 전단류 응력을 가하면 배양된 연골세포에 의해 생성되는 I형 연골에 대한 II형 연골의 비율이 증가되고 연골세포 표현형의 유지능이 향상된다.

대표도

도1

색인어

전단류 응력 인가 생반응기, 액체 성장 배지, 액체 성장 배지와 세포 사이의 상대적 운동

영세서

기술분야

본 발명은 포유 동물 조직 배양 및 인공 연골에 관한 것이다.

배경기술

연골은 관절이 유연하게 운동할 수 있게 해준다. 연골은 본질적으로 밀집된 세포외 매트릭스 (ECM)으로 둘러싸인, 연골세포로 알려진 매우 특수한 세포로 이루어져 있다. 관절 연골의 경우, 조직은 주로 II형 콜라겐, 프로테오글리칸 및 물로 형성된다. 완전히 숙성된 연골은 외상 또는 퇴행성 관절 질환으로 인한 손상에 대해 치유 및 재성장의 능력에 한계가 있다. 손상된 연골을 조직 배양으로 성장시킨 연골로 대체하기 위한 수술 절차가 개발되었다. 조직 공학적 조작에 의해 연골을 발생시킬 때 사용되는 조직 배양된 세포, 예를 들면, 연골세포는 생반응기를 사용하여 성장시킨다.

발명의 개요

본 발명자들은 배양된 연골세포가 전단류 응력 하에서는 일렬로 정렬되지 않음을 발견하였다. 또한, 전단류 응력을 배양된 연골세포에 가하면 연골세포의 표현형 유지능이 향상됨을 발견하였다. 이는 연골세포 중의 II형 콜라겐 침착이 증가됨을 반영한다.

이러한 발견에 기초하여, 본 발명은 인공 연골을 생성하는 생반응기를 특징으로 한다. 본 발명의 생반응기는 배양된 포유 동물 세포를 수용하는 성장 챔버, 이 세포를 부착시키기 위한 기질 및 전단류 응력을 가하는 수단을 포함한다. 생반응기는 약 1 내지 약 100 dyne/cm² 수준의 전단류 응력을 가하고, 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm² 수준의 전단류 응력을 가할 수 있다. 본 발명의 몇몇 실시 양태에서는, 전단류 응력을 저장기, 펌프 및 상호 연결관을 이용하여 가한다. 이들 성분들은 펌프에 의해 가해지는 힘에 대응하여 저장기로부터 성장 챔버를 통해 다시 저장기로 액체 성장 배지의 연속적인 흐름을 유지하도록 배열된다.

생반응기의 기질은 3차원 세포 배양물의 성장을 지지하는 지지대 (scaffold)일 수 있다. 지지대는 생흡수성일 수 있다. 또는 기질은 단층으로 배양된 세포의 성장을 지지하는 무공성 (nonporous) 표면일 수 있다. 무공성 표면은 회전 드럼, 회전 원반 또는 정지판의 매끄러운 표면일 수 있다. 드럼 또는 원반을 사용할 경우, 전단류 응력은 액체 배지를 통한 드럼 또는 원반의 운동, 즉 회전에 의해 발생된다. 정지판을 사용할 경우에는, 펌프로부터 힘을 받으면서 판을 지나는 액체 배지의 운동에 의해 발생된다.

본 발명은 또한, 인공 연골의 생성 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 세포 부착을 위한 기질을 함유하는 성장 챔버를 제공하는 단계; (b) 액체 성장 배지로 기질을 적시는 단계; (c) 배지에 연골세포, 연골세포 간세포, 또는 연골세포의 표현형으로 분화전환되는 세포를 접종하는 단계; (d) 세포를 기질에 부착시키는 단계; (e) 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm², 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력을 가하고 유지하는 단계; 및 (f) 전단류 응력을 받은 세포를 인공 연골을 생성하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함한다.

기질은 지지대일 수 있고, 이 지지대는 생흡수성일 수 있다. 기질은 또한 회전 드럼, 회전 원반 또는 정지판과 같은 무공성 표면일 수 있다.

본 발명의 방법에 따라 성장시킨 전단류 응력을 받은 세포는 향상된 연골세포 표현형의 유지능을 나타낸다. 그 밖에, I형 콜라겐에 대한 II형 콜라겐의 비가 증가된 세포외 매트릭스를 생성한다.

본 발명은 또한 간세포를 연골세포로 세포 분화시키는 방법을 제공한다. 간세포 분화 방법은 (a) 세포 부착을 위한 기질을 함유하는 성장 챔버를 제공하는 단계; (b) 액체 성장 배지로 기질을 적시는 단계; (c) 배지에 포유 동물 간세포를 접종하는 단계; (d) 간세포를 기질에 부착시키는 단계; (e) 간세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm², 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력을 가하고 유지하는 단계; 및 (f) 전단류 응력을 가한 세포를 연골세포로 분화되기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함한다.

본 발명은 또한 배양된 세포를 연골세포로 분화전환시키는 방법을 제공한다. 이 분화전환 방법은 본 발명은 또한 간세포를 연골세포로 세포 분화를 유도하는 방법을 제공한다. 간세포 분화 방법은 (a) 세포 부착을 위한 기질을 함유하는 성장 챔버를 제공하는 단계; (b) 액체 성장 배지로 기질을 적시는 단계; (c) 배지에 연골세포 또는 연골세포 간세포 이외의 포유 동물 세포를 접종하는 단계; (d) 세포를 기질에 부착시키는 단계; (e) 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm², 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력을 가하고 유지하는 단계; 및 (f) 전단류 응력을 가한 세포를 연골세포로 분화전환되기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함한다. 이 분화전환 방법에 사용하는데 바람직한 비연골세포 유형은 섬유아세포 또는 근원세포이다.

본원에 사용된 "생흡수성"은 세포 배양액 내에서 또는 인공 연골 이식 숭용체의 본체 내에서 생분해성임

을 의미한다.

본원에 사용된 "연골세포"는 연골의 세포를 의미한다. 연골세포는 여러 유형의 연골, 예를 들면, 관절(또는 유리질) 연골, 탄성 연골 및 섬유연골에서 발견된다.

본원에 사용된 "기질"은 배양된 세포가 정착되거나 부착되는 성장 챔버 내의 지지 구조물을 의미한다.

본원에 사용된 "지지대"는 배양된 포유 동물 세포를 부착시켜 3차원 배양물을 형성되는 3차원 다공성 세포 배양물 적합성 구조를 의미한다. 본원에서는 지지대가 기질의 한 유형이다.

본원에 사용된 "전단류 응력"은 액체 배지와 세포 사이의 상대적 운동 때문에 배양된 세포 상에 작용하는 유체의 힘을 의미한다. 전단류 응력은 액체를 정지 세포로 이동시키거나, 세포를 정지 액체를 통해 이동시키거나, 액체와 세포를 동시에 이동시켜 발생시킬 수 있다. 전단류 응력은 일반적으로 dyne/cm^2 단위로 정량화한다.

본원에 사용된 "간세포"는 달세포를 발생시키는 분화되지 않은 세포로서 특정 조직을 특징화하는 특수화된 세포로 숙성될 세포를 의미한다.

본원에 사용된 "분화전환"은 분화된 세포가 한 표현형, 예를 들면, 근원세포 또는 섬유아세포로부터 다른 표현형, 예를 들면, 연골세포로 변화되는 것을 의미한다.

달리 지적이 없다면, 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어는 세포 배양 기술 분야에서 당업자들이 통상적으로 이해하고 있는 것과 같은 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 물질 및 방법을 본 발명의 실행 또는 시험에 사용할 수 있으나, 바람직한 방법 및 물질을 하기에 기재하였다. 본원에 언급된 모든 공보, 특히 출원, 특히 및 기타 참고 자료는 본원에 참조 문헌으로 인용되어 있다. 그 밖에, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시를 위한 것이며 제한하려는 것은 아니다.

본 발명의 다른 잇점 및 특징은 상세한 설명 및 청구 범위로 부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 성장 챔버, 펌프, 배지 저장기 및 연결관을 포함하는 전단류 생반응기 시스템의 다이아그램 설명도이다.

도 2는 액체 배지 중에 일부분 이상이 잠겨 있는 중심을 공유하는 내부 및 외부 드럼을 갖는 전단류 성장 챔버의 다이아그램 설명도이다.

도 3은 성장 챔버 내에서 회전하는 원반을 갖는 전단류 성장 챔버의 다이아그램 설명도이다.

도 4는 성장 챔버 내부에 평행한 정지판을 갖는 전단류 성장 챔버의 다이아그램 설명도이다.

도 5는 2주 및 4주에 인공 연골 구성에 있어서 콜라겐 및 술페이트화 GAG 농도에 대한 데이터를 요약한 막대 그래프이다. 흰 부분은 술페이트화 GAG이고, 검은 부분은 콜라겐이다.

도 6은 2주 및 4주된 인공 연골 및 천연 연골 구성에 있어서 콜라겐 및 술페이트화 GAG 농도에 대한 데이터를 요약한 막대 그래프이다. 흰 부분은 술페이트화 GAG이고, 검은 부분은 콜라겐이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 인공 연골 제조에 사용되는 포유 동물의 세포 배양물에 전단류 응력을 가하는 장치 및 방법을 제공한다.

3차원 또는 단층 연골세포 배양물에 전단류 응력을 가하면 연골세포에 의해 생성되는 I형 콜라겐에 대한 II형 콜라겐의 비가 유리하게 증가된다. 전단류 응력은 또한 연골세포 표현형의 유지능을 유리하게 증진시킨다. 그리하여, 본 발명에 따라 전단류 응력을 가하면 3차원 또는 단층 연골세포 배양물의 기능적 성과가 개선되고 단층 배양물의 유효 수명이 증가된다.

간세포에 전단류 응력을 가하는 것은 간세포의 연골세포로의 분화를 유도하거나 촉진시킨다. 간세포의 연골세포로의 분화를 유도하거나 촉진시키는 것은, 연골세포에 대해 본 명세서에 기재한 전단류법으로 연골세포를 간세포로 대체함으로써 수행된다. 간세포 분화법으로부터 생성된 연골세포를, 전단류 응력하에서 인공 연골이 형성되기에 충분한 시간 동안 배양액에 유지한다.

전단류 응력을 또한 본 발명에 따라 사용하여 분화된 세포를 연골세포로 분화전환되도록 유도할 수 있다. 분화전환은, 연골세포에 대해 본원에 기재한 전단류법으로 연골세포 이외의 분화된 세포, 예를 들면, 근원세포 또는 섬유아세포를 대체시킴으로써 수행된다. 전단류 응력에 의해, 분화된 세포는 연골세포로 분화전환된다. 분화전환법에 따라 생성된 연골세포는, 전단류 응력하에서 인공 연골이 형성되기에 충분한 시간 동안 배양액 중에 유지한다.

본 발명의 임의의 실시태양에 따라 제조된 인공 연골은, 손상되거나 유실된 연골을 대체하는 기존의 정립된 의학적 절차에 따라 외과적 이식에 사용될 수 있다. 전형적으로, 인공 연골은 사람의 관절, 예를 들면 무릎 또는 팔꿈치의 치료에 사용된다.

본 발명의 장치 및 방법에서, 전단류 응력은 다양한 수단에 의해 배양된 세포에 가해질 수 있다. 예를 들면, 액체 성장 배지에 잠긴 회전 드럼 또는 회전 원반 표면 상에 연골세포 단층을 성장시킴으로써 전단류 응력을 가할 수 있다. 다른 방법으로는, 액체 성장 배지를 펌핑(pumping)시키는 정지판 상에 연골세포 단층을 성장시킴으로써 전단류 응력을 가할 수 있다. 전단류 응력은 또한 액체 성장 배지가 펌핑되는 챔버에 3차원 연골 세포 배양물을 확립시킴으로써 3차원 연골세포 배양물에 가할 수 있다.

연골세포에 가해진 전단류 응력의 정도는, 드럼 또는 원반의 회전 속도를 조절하거나, 또는 액체 배지의

펌핑 속도를 조절하여 제어한다. 본 발명에서, 연골세포 또는 다른 세포에 가해진 전단류 응력의 정도는 약 1 내지 약 100 dyne/cm²이다. 바람직하게는, 전단류 응력은 약 1 내지 약 50 dyne/cm²이다. 전단류 응력은 하기 수학식 1에 따라 계산된다.

$$\text{전단류 응력} = \gamma = 6 \mu Q/bh^2 \text{ dyne/cm}^2$$

식 중,

μ 는 유체의 점도(N sec/cm²)이고,

Q는 유속(cm/분)이고,

b는 챔버 폭(cm)이고,

h는 챔버 높이(cm)이다.

배양된 연골세포

바람직하게는, 배양된 연골세포를 단층으로 성장시키든지 또는 3차원 배양물로 성장시키든지 간에 기질에 정착, 즉 부착된다. 생반응기 중의 단층 지지면, 또는 3차원 지지대에 분화전환에 적합한 연골세포, 간 세포 또는 분화된 세포를 접종한다. 인공 연골은, 통상적인 포유 동물 조직 배지, 예를 들면, RPMI 1640, 피셔(Fisher's) 배지, 이스코브(Iscove's) 배지 또는 맥코이(McCoy's) 배지에서 연골세포를 성장시킴으로써 생성할 수 있다. 이와 같은 배지는 당업계에 공지되어 있으며, 시판되고 있다. 전형적으로, 세포는 5% CO₂가 보충된 공기 중에 37°C에서 배양한다. 이런 조건하에서, 연골세포 단층 또는 3차원 연골 매트릭스는 접종 및 배양 조건에 사용되는 세포 유형에 따라 약 7 내지 56일 후에 생성된다.

반응기 표면 또는 3차원 매트릭스를 접종하는데 단리된 연골세포를 사용할 수 있다. 또는 간세포, 또는 분화전환에 적합한 세포를 접종에 사용할 수 있다.

본 발명에 사용되는 배양물의 접종에 사용되는 세포는 임의의 적합한 방법에 의해 단리할 수 있다. 연골 세포 단리를 위한 여러 가지 출발 재료 및 방법이 알려져 있다. 일반적으로, 문헌[Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 2d ed., A.R. Liss Inc., New York, pp137-168(1987)]을 참조한다. 연골세포 단리를 위한 출발 재료의 예로는 포유 동물 무릎 관절 또는 늑골 케이지를 들 수 있다.

출발 재료가, 연골세포가 본질적으로 존재하는 유일한 세포형인 조직, 예를 들면, 관절 연골인 경우에는, 통상적인 콜라겐나제 소화법 및 조직 배양법에 의해 세포가 직접적으로 얻을 수 있다. 또는 출발 재료 중에 존재하는 다른 세포형으로부터 세포를 단리할 수 있다. 연골세포 단리에 대해 공지된 방법으로는 플라스틱 조직 배양 용기애의 분화 접착법을 들 수 있다. 제2의 방법에서는, 연골세포 표면 마커에 결합하는 항체를 조직 배양 판에 코팅하고, 이어서 이종의 세포군으로부터 연골세포를 선택적으로 결합시키는 데 사용할 수 있다. 제3의 방법에서는, 연골세포-특이성 항체를 사용하는 형광 활성화 세포 분류법(FACS)을 사용하여 연골세포를 단리한다. 제4의 방법에서는, 피콜(Ficoll)과 같은 밀도 구배에 의한 원심분리법에 의해 연골세포를 그의 부유 밀도를 기초로 단리한다.

분화를 위한 간세포, 또는 분화전환에 적합한 분화된 세포를 단리할 수 있는 조직의 예로는 태반, 텃줄, 골수, 피부, 근육, 골막, 또는 연골막이 있다. 세포는 통상적인 방법을 사용하여 체외이식조직 배양 및 (또는) 주변 매트릭스의 효소 소화에 의해 이들 조직으로부터 단리될 수 있다.

인공 연골 구조물이 목적하는 크기 및 조성으로 성장하면, 한성(寒性)보존 유체를 이 시스템에 도입시킬 수 있다. 한성보존 유체는 나종의 사용을 위해 인공 연골 구조물을 동결시킨다. 포유 동물 조직 배양 재료를 위한 한성보존법 및 재료는 당업계의 통상의 숙련자에게 공지되어 있다.

생반응기 유동 시스템

도 1에 나타낸 본 발명의 일부 실시태양에서는, 성장 챔버(11)를 갖는 순환 유동 시스템(16)을 사용한다. 순환 유동 시스템(16)은 배지 저장기(9), 펌프(10), 성장 챔버(11), 및 관(12)을 포함한다.

임의의 살균 액체 용기를 저장기(9)로 사용할 수 있다. 바람직한 저장기의 일형태는 살균 백이다. 적합한 살균 백은 예를 들면, Gibco/BRL로부터 구입가능하다. 본 발명의 일부 실시태양에서는, 상부 저장기를 생반응기의 상류에, 하부 저장기를 생반응기의 하류에 배치하고, 펌프가 하부 저장기로부터 상부 저장기로 액체 배지를 반송시킨다.

저장기(9)는 살균 가스의 직접적인 원료를 시스템 중의 액체에 제공하는 살균 여과기를 포함할 수 있다. 또는 저장기(9)는 예를 들면, 확산에 의해 살균 가스의 간접적인 원료를 시스템에 제공하기 위해 실리콘 또는 테프론으로 만들어진 기체 투과성 관 또는 막을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 1개 이상의 밸브 및 유동 계량기를 유동 시스템에 포함한다.

펌프(10)는 살균 조건하에서 저장기(9)로부터 성장 챔버(11)로 액체를 전달하고, 이를 반송시킨다. 대개, 펌프(10)은 시스템 내의 유속 및 유압 모두를 제어한다. 펌프(10)은 연동 펌프일 수 있다. 또는 고대 압력원을 갖는 탄성 블레이더를 사용할 수 있다. 외압을 변화시킴으로써 블레이더를 팽창시키거나 수축시킬 수 있다. 한쌍의 점검 밸브를 사용하여, 시스템 내의 살균 유체를 한 방향으로만 이동시킬 수 있다.

시스템 내부에서 살균액을 순환시키는 연결관(12)은 스테인레스 강철 파이프, 또는 내구성 의료용 플라스틱관일 수 있다. 또는 관(12)는 실리콘과 같은 기체 투과성 재료일 수 있다.

3차원 배양물

포유 동물 세포의 3차원 배양을 위한 방법 및 재료는 당업계에 알려져 있다. 예를 들면, 미국 특허 제 5,266,480호를 참조한다. 대개, 지지대를 생반응기 성장 챔버 중에 사용하여 3차원 배양물을 지지한다. 지지대는, 배양된 포유 동물 세포가 유입되고 부착 또는 정착되는 임의의 다공성 조직 배양 적합성 재료로 만들어질 수 있다. 이러한 재료로는 나일론(폴리아미드), 다크론(폴리에스테르), 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 클로라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌(테프론), 니트로셀룰로오스 및 면을 들 수 있다. 바람직하게는, 지지대는 폴리글리콜산, 장선 봉합 재료, 또는 젤라틴과 같은 생합성 또는 생분해성 재료이다. 일반적으로, 지지대의 형태는 중요하지 않다.

임의로, 연골세포를 지지대에 접종하기 전에, 간질 세포를 지지대에 접종하여 간질 매트릭스를 형성하게 한다. 이어서, 연골세포를 간질 매트릭스 내에 접종한다. 간질 세포는 섬유아세포를 포함할 수 있다. 간질 세포는 또한 다른 세포형을 포함할 수 있다.

3차원 배양물이 도 1에 개략적으로 도시된 순환 유동 시스템(16)에 사용될 수 있다. 3차원 배양물을 포함한 성장 챔버를 통해 펌핑된 액체 배지의 이동에 의해 전단류 응력이 연골세포에 가해진다. 지지대와 부착된 세포는 움직이지 않는 것이 바람직하다.

2개의 생반응기 시스템, 즉, 아폴로(Apollo) 및 제미니(Gemini) I으로부터 얻어진 데이터는, 유속의 증가, 즉 전단 응력의 증가가 인공 연골을 제조하는데 사용되는 3차원 배양물의 연골 성능을 향상시킴을 나타낸다.

아풀로 생반응기

치사시킨 후 4 시간 이내에, 골격이 충분히 발육된 뉴질랜드 백색 토끼의 대퇴부/경골 관절부로부터 관절 연골을 무균적으로 채취하였다. 연골세포를 문헌[Dunkelman 등, Biotech. Bioengineering 46: 299-305(1995)]에 기재된 바와 같이 콜라겐나제 소화에 의해 단리시켰다. 이어서, 이들을 배지(10% 우태아 혈청 10%, 2 mM L-글루타민, 2 mM 비필수 아미노산, 50 mg/ml 프롤린, 1 mM 나트륨 피루베이트, 및 35 mg/ml 젠타마이신을 함유한 DMEM)에서 2회의 진행 기간 동안 성장시켰다.

사출 성형한 폴리카르보네이트 생반응기(1.2 ml 내부 부피)를 기체 투과성 실리콘 및 바이오프렌 관을 사용하여 조합하고, 전자 빔 복사(2.5 Mrad)에 의해 살균하였다. 폴리글리콜산(PGA) 메쉬(52 mg/cc, 비열도금처리, 두께 1.9 mm, 직경 1 cm, 다공도 97% 공극 부피)를 산화에틸렌 가스에 의해 살균처리하고 사용 전까지 질소하에 보관하였다. 살균 PGA 메쉬를 37°C에서 밤새 배지로 예비흡수시키고 살균 생반응기 시스템에 넣었다.

각각의 생반응기 시스템 (5개 연결된 생반응기)이 배지 35 ml 중에 30×10^6 개의 세포를 함유한 세포 혼탁액이 담긴 배지 백에 부착되는 재순환 시딩 (seeding) 법을 사용하여 메쉬를 시딩시켰다. 이 시스템을 펌프(Cole-Parmer)에 연결시켜 0.2 ml/분의 배지 유속을 얻고, 37°C의 습윤화 인큐베이터에 위치시켰다. 시딩후, 구조물을 아스코르베이트(50 μ g/ml)를 함유한 배지를 사용하여 0.05 ml/분의 유속으로 배양하였다. 밤새 인큐베이션시킨 후, 유속을 0.2 ml/분으로 증가시키고, 이어서 주 1회 0.2 ml/분씩 증가시켰다. 유동 방향은 주당 5일 변화시켰다.

2 또는 4주 동안의 배양 후, 문헌[Biochem. Biophys. Acta 883:173-177(1986)]에 기재된 디메틸메틸렌 블루 결합법에 의해, 총 솔페이트화 글리코스아미노글리칸(GAG)에 대해 연골 구조물을 분석하였다. 문헌 [Woessner 등, Arch. Biochem. Biophys. 93:440-447(1961)]에 기재된 바와 같이 히드록시프롤린 정량화에 의해 전체 연골을 분석하였다. 각 시료를 채취하고, 10% 완충화 포르말린에 고정하고, 파라핀에 매립시켰다. 5 미크론 시료 구간을 사프라닌 0 (Safranin 0) 또는 콜라겐 형체 (알라바마주 비르밍엄 소재의 Southern Biotech)로 염색하여 솔페이트화 글리코스아미노글리칸(GAG)의 양과 분포 및 콜라겐 유형을 평가하였다.

유체역학적 조건에서 2 내지 4 주동안 배양하자, 연골 구조를 상의 콜라겐과 솔페이트화-GAG의 퍼센트 이외에, 농도의 현저한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다(도 5 및 도 6). 4주째에 농도가 토끼 성체의 관절 연골의 농도와 크게 다르지 않았다(도 6). 콜라겐 농도가 배양 2 내지 4 주 사이에 증가했으나, 4주째에 콜라겐 함량은 토기 관절 연골의 함량보다 여전히 낮았다. 이와 같이 유체역학적으로 성장시킨 구조물에 비해, 동일한 시간동안 정지상태로 유지된 배양물에는 더 적은 콜라겐과 솔페이트화-GAG가 존재했다.

조직학적으로, 유체역학적 조건에서 성장시킨 구조를 상에 침착된 솔페이트화-GAG 패턴은 천연의 토끼 관절 연골과 유사한 반면, 정지상태로 성장한 구조를 상에 침착된 솔페이트화-GAG의 패턴은 불균일하고 구조물의 중앙에는 솔페이트화-GAG가 거의 없었다. II형 콜라겐은 천연 관절 연골에서 관찰되는 것과 유사한 분포로 면역염색된 구조물에 존재한다. 소와(小窩)가, 정지상태가 아닌 유체역학적으로 유지되는 구조물 중의 다수의 세포를 둘러쌌다.

제미니(Gemini) I 생반응기

눈금이 있는 생반응기를 사용하여 수행된 실험에서 유사한 결과가 얻어졌다. 토끼 연골세포를 $30 E^6$ 세포/시스템으로 시딩하고, 0.05 ml/분의 일정 유속으로, 또는 0.05에서 0.8 ml/분으로 점진적으로 증가되는 유속으로 성장시켰다. 증가되는 유속하에서 성장시킨 세포는 매트릭스 침착이 보다 더 많이 나타났다. 증가되는 유속에서 성장한 배양물에서, 글리코스아미노글리칸(GAG) 농도는 25% 내지 50%인 반면, 낮은 유속(0.05 ml/분)에서 성장시킨 비교용 세포에서는 GAG 농도각 약 3%였다. 증가되는 유속에서 성장시킨 배양물에서, 콜라겐 농도는 12% 내지 20%인 반면, 낮은 유속(0.05 ml/분)에서 성장시킨 비교용 세포에서는 콜라겐 농도가 약 5%였다.

단층 배양물

다양한 방법으로 연골세포 단층에 전단류 응력을 가하도록 생반응기를 고안할 수 있다. 이로 인해 연골

세포 표현형이 유도 및 유지된다.

도 2는 공심 드럼(1,2)을 포함하는 전단류 성장 챔버(3)을 개략적으로 나타낸다. 드럼(1,2) 중의 어느 하나 또는 모두의 표면은 세포를 부착시키기 위한 기질로서 작용할 수 있다. 드럼 중 하나를 정지상태로 유지시키고, 다른 드럼은 회전시킬 수 있다. 또는, 2개의 드럼을 모두 회전시킬 수 있다. 어떠한 장치이든지, 드럼(1,2)는 액체 성장 배지(15) 중에 적어도 부분적으로 잠긴다. 드럼에 정착된 세포와 액체 성장 배지(15) 간의 상대적인 운동에 의해 전단류 응력이 발생한다.

세포에 가해지는 전단류 응력의 정도는, 상기 수학식 1에 따라 드럼 회전 속도를 조정함으로써 조절할 수 있다. 드럼(1,2) 간 거리(13)이 수학식 1에서 변수(h)이다. 드럼 회전 속도는 바람직하게는, 약 1 내지 약 100 dyne/cm², 보다 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력이 얻어지도록 선택된다. 드럼은 가변 속도 전기 모터에 의해 회전시키는 것이 바람직하다. 2개의 드럼 간의 최적 거리는 드럼 크기 및 제조 원료를 포함하는 다양한 요소에 좌우된다. 최적 드럼 구조는 당업계 숙련자가 결정하는 바에 따른다. 전단류 응력은 드럼의 회전에 의해 발생되므로, 액체 저장기 및 펌프를 포함하는 연속 유동 장치는 자유 선택 사항이다.

도 3은 성장 챔버(5) 내에 회전 원반(4)을 포함하는 전단류 성장 챔버(5)를 예시한다. 원반(4)가 액체 배지(15)에 잠겨 있으며, 세포의 부착을 위한 기질로서 작용한다. 세포에 가해지는 전단류 응력의 정도는, 상기 수학식 1에 따라 원반 회전 속도를 조정함으로써 조절될 수 있다. 원반(4)과 성장 챔버 벽 간 거리(13)이 수학식 1에서 변수(h)이다. 원반 회전 속도는 바람직하게는, 약 1 내지 약 100 dyne/cm², 보다 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력이 얻어지도록 선택한다. 임의로, 다수의 원반을 단일 회전 샤프트 상에 위치시켜 세포 부착 및 성장을 지지하는데 유용한 총 표면적을 증가시킬 수 있다. 대개, 원반은 가변 속도 전기 모터에 의해 회전시킨다. 전단류 응력은 원반의 회전에 의해 발생되므로, 액체 저장기 및 펌프를 포함하는 연속 유동 장치는 자유 선택 사항이다.

회전 원반의 주변부 근처에 위치한 세포는 중앙 샤프트(shaft) 근처에 위치한 세포에 비해 큰 속도로 움직이다. 따라서, 이들은 보다 큰 전단류 응력을 받게 된다. 이 효과의 정도는 원반 크기에 좌우된다. 그리하여, 본 발명의 회전 원반 실시태양에서는, 단일 생반응기 내에서 연속적인 범위의 전단류 응력을 노출된 세포를 동시에 성장시킬 수 있다. 이러한 장치는 일정한 배지 중에서 주어진 유형의 세포에 가해지는 전단류 응력 정도를 변화시켜 얻어지는 효과를 체계적으로 비교하는데 이용할 수 있다.

도 4는 성장 챔버(8) 내부에 2개의 평행한 정지판 또는 벽(6,7)을 포함하는 전단류 성장 챔버(8)를 예시한다. 한 쌍의 정지판(6,7)을 사용할 수 있으며, 또는 1쌍 이상을 동일한 성장 챔버(8)에 사용할 수 있다. 판(6,7)이 정지상태이므로, 전단류 응력은 챔버(8)를 통해 펌핑된 액체 배지(15)의 운동에 의해서만 발생한다. 액체 배지(15)는 평행한 판(6,7)을 지나 펌핑되어, 약 1 내지 약 100 dyne/cm², 바람직하게는 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력을 발생시킨다. 전단류 응력은, 상기 수학식 1에 따라 액체 배지(15) 유속을 조정함으로써 조절한다. 정지판(6,7) 간의 거리(13)이 수학식 1에서 변수(h)이다. 정지판(6,7)은 서로 평행하고, 액체 성장 배지(15)의 우세한 유동 방향에 대해 오른쪽 방향으로 각을 이루는 것이 바람직하다.

판(6,7)의 수를 증가시키는 이점은, 세포가 단층을 형성할 수 있는 총 표면적이 보다 커진다는 점이다. 단층 판의 잠재적인 단점은 판의 수가 증가됨에 따라, 챔버(8) 전체 전단류 응력의 균일성을 유지하기가 비교적 더욱 어려워질 수 있다는 것이다. 전단류 응력의 균일성을 유지하는 한가지 방법은, 챔버(8) 한 벽 상의 넓은 면적 위에 유입되는 액체 배지(15a)를 분산시키면서, 챔버의 반대 벽의 비교적 넓은 면적으로부터 유출되는 액체 배지(15b)를 수집하는 것이다.

회전 드럼(1,2), 회전 원반(4), 또는 정지판(6,7)는 조직 배양 적합성 재료로 만들어져야 한다. 다양한 조직 배양 적합성 재료가 알려져 있으며, 예를 들면, 폴리스티렌, 폴리카르보네이트, 및 스테인레스 강철이 있다. 성장 챔버의 벽 및 단층 지지 기질에 적합한 재료는 당업계 숙련자가 선택하는 바에 따른다.

하기 실험에서, 생반응기 내의 액체 유속은, 미리 선택된 전단류 응력의 정도가 약 1 dyne/cm², 및 약 24 dyne/cm²이 얻어지도록 조절되었다. 액체 배지의 정도 (μ)는 0.0012 N 초/m²이고, 챔버 폭(b)은 2.5 cm이고, 챔버 높이(h)는 0.025 cm였다. 상기 수학식 1을 사용하여, 전단류 응력이 1 dyne/cm²인 경우에는 유속(Q)가 1.3 ml/분이어야 하는 것으로 계산되었다. 전단류 응력이 24 dyne/cm²인 경우에는 유속(Q)가 31.25 ml/분이어야 하는 것으로 계산되었다.

연골세포를 시딩시키기 위해, 판(7.5 cm x 3.75 cm)을 큰 조직 배양 디쉬로부터 절단하였다. 판을 70% 에탄올로 처리하고, 이어서 박총 유동 후드에서 자외선으로 1 시간 동안 처리하여 멸균하였다. 이어서, 판을 페트리 접시에 위치시키고, 판 당 약 100,000개의 세포 밀도로 2회 통과 토끼의 연골세포의 1 ml 혼탁액으로 판을 덮었다. 이 절차에 사용된 세포 배지는 아스코르베이트가 없는 완전한 배지가었다. 판을 배지로 덮고, 6시간 동안 방치하였다. 이어서, 인큐베이터로 옮기어 2일 동안 37°C에 두었다. 추가 배지 약 15 ml를 첨가하고, 판을 유동 루프에 위치시켰다. 이 단계에서, 세포는 자용합성이었다.

실험을 수행하여 이 시스템의 저 유속 및 고 유속에서 얻어진 결과를 비교하였다. 1 dyne/cm²를 생성시키는 저 유속을 사용하였고 연골세포의 밀도는 1 rpm에서 작동하는 전단 응력 를러 병 장치에 사용된 밀도와 비교할만한 수준이었다. 24 dyne/cm²를 생성시키는 고 유속을 또한 비교를 위해 시험하였다.

결과는 연골세포 콜라겐 제조에 있어서 전단류 응력에 따른 차이를 나타내었다. 정지상태 를러 병에서 얻어진 결과와 비교할 때, 24 dyne/cm²에서 I형 콜라겐의 생성이 감소되었다. 정지상태 를러 병에서 얻어진 결과와 비교할 때, 24 dyne/cm²에서 II형 콜라겐의 생성이 증가되었다. 이 실험의 전단 응력 조건에서, 유동 방향으로 세포가 배향되지 않았다.

다른 실시태양은 하기 청구의 범위에 포함된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

성장 챔버, 연골 조직을 생성할 수 있는 세포를 부착시키기 위한 기질 및 액체 배지와 기질 사이에 상대적 운동을 가하여 상기 기질에 부착된 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm²의 전단류 응력을 가하는 수단을 포함하는 연골을 생성하기 위한 생반응기.

청구항 2

제1항에 있어서, 약 1 내지 약 50 dyne/cm²의 전단류 응력을 가하는 수단을 더 포함하는 생반응기.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전단류 응력을 가하는 수단이 저장기, 펌프 및 상기 성장 챔버, 상기 저장기 및 상기 펌프를 상호연결하는 관 (이 관은 상기 펌프에 의해 가해지는 힘에 대응하여 상기 저장기로부터 상기 성장 챔버를 통해 다시 상기 저장기로 액체 성장 배지의 연속적인 흐름을 유지시킨다)을 포함하는 생반응기.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 기질이 지지대 (scaffold)인 생반응기.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 지지대가 생흡수성인 생반응기.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 기질이 단일층으로 상기 세포의 성장을 지지하는 무공성 (nonporous) 표면인 생반응기.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 무공성 표면이 회전 드럼의 표면인 생반응기.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 무공성 표면이 회전 원반의 표면인 생반응기.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 무공성 표면이 정지판인 생반응기.

청구항 10

- (a) 세포 부착을 위한 기질을 포함하는 성장 챔버를 제공하는 단계;
- (b) 상기 기질을 액체 성장 배지로 덮는 단계;
- (c) 상기 배지에 연골 생성할 수 있는 세포를 접종하는 단계;
- (d) 상기 세포를 상기 기질에 부착시키는 단계;
- (e) 상기 액체 성장 배지와 상기 기질에 부착된 세포 사이에 상대적 운동을 가하고 유지함으로써 상기 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm²의 전단류 응력을 제공하여 전단류 응력을 받은 세포를 생성하는 단계; 및
- (f) 상기 전단류 응력을 받은 세포를 연골을 생성하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 연골의 생성 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 전단류 응력이 약 1 내지 약 50 dyne/cm²인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 기질이 지지대인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 지지대가 생흡수성인 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 기질이 단일층으로 상기 세포의 성장을 지지하는 무공성 표면인 방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 무공성 표면이 회전 드럼의 표면인 방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 상기 무공성 표면이 회전 원반의 표면인 방법.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 무공성 표면이 정지판인 방법.

청구항 18

제10항에 있어서, 상기 전단류 응력을 받은 세포가 (a) 향상된 연골세포 표현형 유지능을 나타내고, (b) I형 콜라겐에 대한 II형 콜라겐의 비가 증가된 세포외 매트릭스를 생성하는 방법.

청구항 19

- (a) 세포 부착을 위한 기질을 포함하는 성장 챔버를 제공하는 단계;
- (b) 상기 기질을 액체 성장 배지로 덮는 단계;
- (c) 상기 배지에 포유 동물 간세포를 접종하는 단계;
- (d) 상기 세포를 상기 기질에 부착시키는 단계;
- (e) 상기 액체 성장 배지와 상기 기질에 부착된 세포 사이에 상대적 운동을 가하고 유지함으로써 상기 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm²의 전단류 응력을 제공하여 전단류 응력을 받은 간세포를 생성하는 단계; 및
- (f) 전단류 응력을 받은 간세포를 연골세포로 분화되기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 간세포를 연골세포로 분화시키는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 전단류 응력이 약 1 내지 약 50 dyne/cm²인 방법.

청구항 21

- (a) 세포 부착을 위한 기질을 포함하는 성장 챔버를 제공하는 단계;
- (b) 상기 기질을 액체 성장 배지로 덮는 단계;
- (c) 상기 배지에 연골세포 또는 연골 간세포 이외의 포유 동물 세포를 접종하는 단계;
- (d) 상기 세포를 상기 기질에 부착시키는 단계;
- (e) 상기 액체 성장 배지와 상기 기질에 부착된 세포 사이에 상대적 운동을 가하고 유지함으로써 상기 세포에 약 1 내지 약 100 dyne/cm²의 전단류 응력을 제공하여 전단류 응력을 받은 세포를 생성하는 단계; 및
- (f) 전단류 응력을 받은 세포를 연골세포로 분화전환되기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함하는 배양된 세포를 연골세포로 분화전환시키는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 전단류 응력이 약 1 내지 약 50 dyne/cm²인 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 분화된 포유 동물 세포가 성유아세포 및 근원세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 세포가 연골세포, 연골세포 간세포, 간엽 간세포 및 연골세포 표현형으로 분화전환되는 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 생반응기.

청구항 25

제4항에 있어서, 지지대가 생물학적 적합성인 생반응기.

청구항 26

제25항에 있어서, 지지대가 생분해성이 생반응기.

청구항 27

제25항에 있어서, 지지대가 생분해성이 아닌 생반응기.

청구항 28

제10항에 있어서, 세포가 연골세포, 연골세포 간세포, 간엽 간세포 및 연골세포 표현형으로 분화전환되는 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 29

제12항에 있어서, 지지대가 생물학적 적합성인 방법.

청구항 30

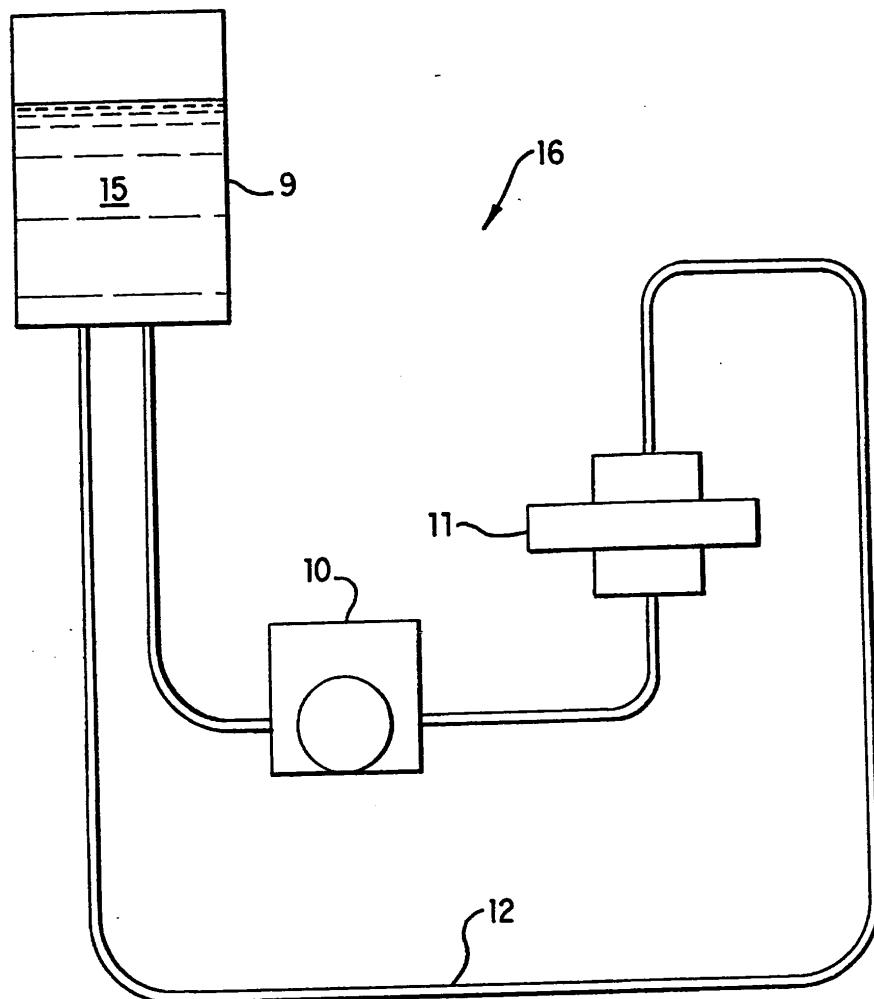
제29항에 있어서, 지지대가 생분해성이 방법.

청구항 31

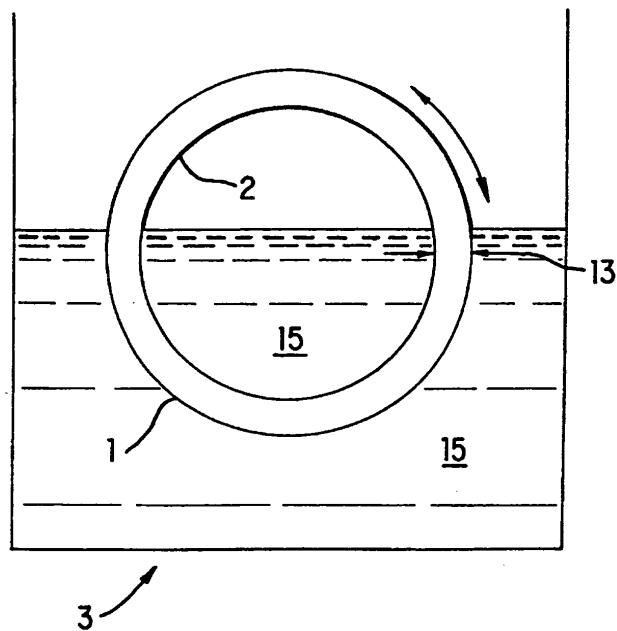
제29항에 있어서, 지지대가 생분해성이 아닌 방법.

도연

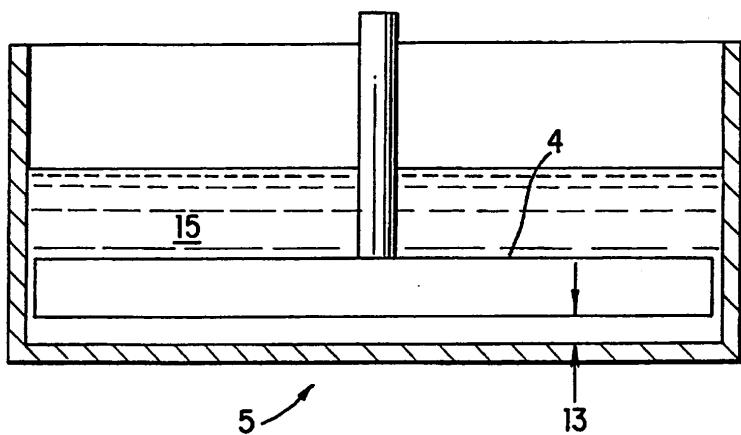
도면 1



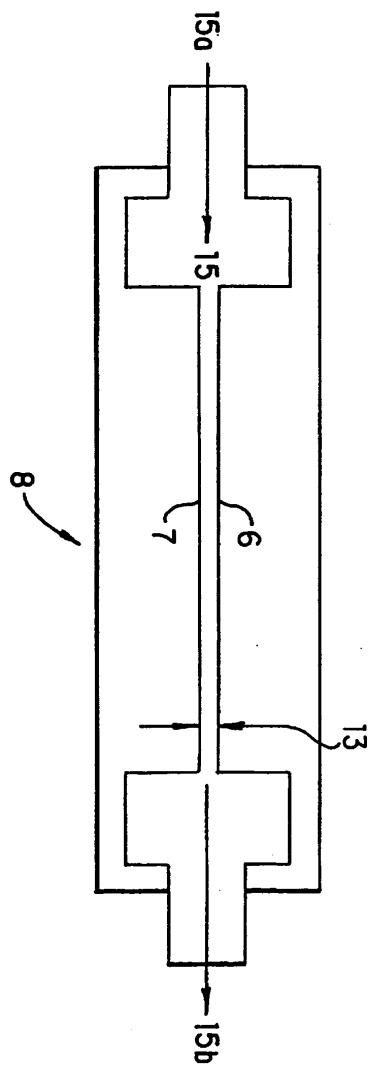
도면2



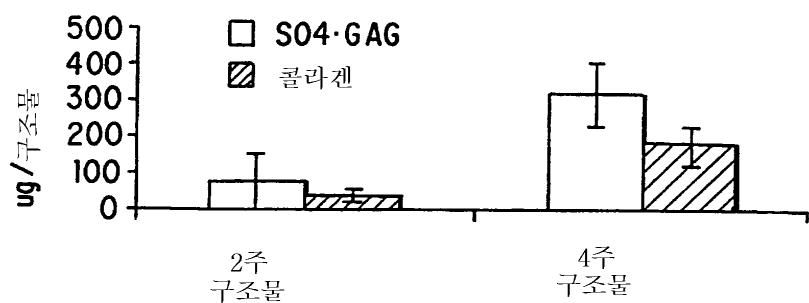
도면3



도면4



도면5



도면6

