



- (51) 국제특허분류:
A61F 2/08 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
A61L 2/025 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001443
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 24일 (24.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0018216 2011년 2월 28일 (28.02.2011) KR
10-2012-0018650 2012년 2월 23일 (23.02.2012) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 주식회사 코리아본뱅크 (KOREA BONE BANK CO., LTD.) [KR/KR]; 서울시 금천구 가산동 345-30 에이스테크노9차 402호, 153-782 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 심영복 (SHIM, Young Bock) [KR/KR]; 서울시 강남구 도곡동 467 타워팰리스

아파트 A-4501, 135-542 Seoul (KR). 이광일 (LEE, Kwang Il) [KR/KR]; 경기도 안양시 만안구 안양 9동 1055-1 극동메모리스 101-602, 430-843 Gyeonggi-do (KR). 장주웅 (JANG, Ju Woong) [KR/KR]; 서울시 동작구 본동 신동아아파트 4-307, 156-060 Seoul (KR). 이정수 (LEE, Jung Soo) [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 입북동 810번지 서수원자이아파트 116-1002, 441-470 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 리앤목특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 서울시 서초구 서초동 1575-1, 137-875 Seoul (KR).

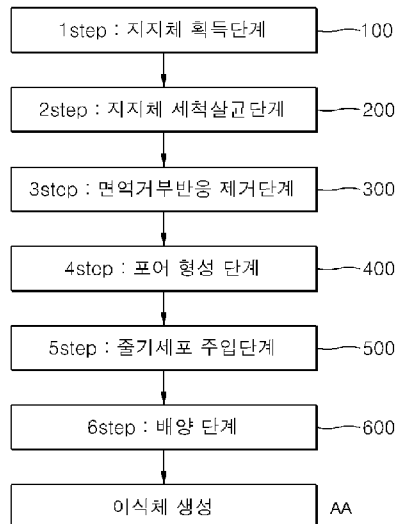
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR MANUFACTURING ALLOGENEIC SOFT-TISSUE TRANSPLANT HAVING AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTED THEREIN

(54) 발명의 명칭 : 자가 줄기 세포가 이식된 동종 연조직 이식체를 제조하는 방법

[Fig. 1]



AA ... Generate transplant
100 ... 1 step: Step for obtaining a base
200 ... 2 step: Step for cleaning and sterilizing the base
300 ... 3 step: Step for removing an immune rejection response
400 ... 4 step: Step for forming a pore
500 ... 5 step: Step for injecting a stem cell
600 ... 6 step: Step for incubating

(57) Abstract: The present invention relates to a method for manufacturing an allogeneic soft-tissue transplant having an autologous stem cell injected therein on the basis of an allogeneic soft tissue base derived from an allogeneic organism, and the present invention enables the manufacturing of an allogeneic soft tissue transplant for efficiently replacing a damaged soft tissue of a human body.

(57) 요약서: 본 발명은 동종 생물체로부터 유래된 동종 연조직 지지체를 기반으로 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 이식체를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 이에 따르면, 인체의 손상된 연조직을 효율적으로 대체할 수 있는 동종 연조직 이식체를 제조할 수 있다.



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 자가 줄기 세포가 이식된 동종 연조직 이식체를 제조하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 동종 생물체로부터 유래된 연조직을 지지체로 하여 인체에 이식되는 동종 연조직 이식체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 전 세계적으로 건강에 대한 관심은 나날이 증가하고 있다. 특히, 꾸준한 운동은 건강한 삶을 유지하는 필수적인 조건으로 인정되고 있는 실정이다. 그러나, 적절한 운동은 건강 유지에 도움이 되지만, 과도한 운동은 오히려 건강에 해를 끼칠 수 있다. 대표적인 예로서, 과도한 운동에 의해 근골격계에 이상이 생길 경우 환자는 거동조차 불가능하고, 오랜 기간 동안 물리치료 등을 받지 않으면 완치되기 어려운 경우가 빈번하다. 특히 슬관절 부위 중 십자인대가 손상되는 경우 물리치료만으로는 이러한 손상을 회복시킬 수 없고, 그나마 환자 본인의 자가 조직을 이식하는 방법으로 치료하고 있는 실정이다. 그러나, 상기 자가 조직의 이식도 지속적인 재활 치료가 요구되고, 본래 고유의 인대와는 달리 이식된 자가 조직은 그 물성이 현저하게 떨어져서 실질적인 치료로 볼 수 없다. 따라서, 손상된 인대, 즉 손상된 연조직을 치료하기 위하여 본연의 물성이 유지되고, 면역 거부 반응을 현저하게 줄일 수 있으며, 환자 본인의 고유 연조직과 최대한 유사하게 대체될 수 있는 동종 연조직 이식체가 요구되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [3] 본 발명은 인체의 손상된 연조직을 효율적으로 대체할 수 있도록 동종 생물체로부터 유래된 동종 연조직 지지체를 기반으로 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 이식체를 제조하기 위함이다.

과제 해결 수단

- [4] 본 발명은 인간 또는 동물의 몸체로부터 획득된 동종 연조직 지지체를 획득하는 단계; 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계; 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리하여 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계; 상기 면역 거부 반응 세포가 제거된 동종 연조직 지지체에 하나 이상의 포어를 형성하는 단계; 상기 형성된 포어에 사용자의 자가 줄기 세포를 주입하는 단계; 및 상기 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계를 포함하는, 자가 줄기 세포가 이식된 동종 연조직 이식체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [5] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 동종 연조직 지지체는 인대, 또는 뼈 단편

연결 인대일 수 있다.

- [6] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 세척 및 살균 단계는 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고, 초음파를 적용하는 단계를 포함할 수 있다.
- [7] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 처리되는 과산화수소는 0.1 내지 5.0 퍼센트(%) 농도 범위 중 선택되는 농도를 갖고, 상기 적용되는 초음파는 120 내지 400 와트(W) 범위 중 선택되는 출력을 가질 수 있다.
- [8] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 세척 및 살균 단계는 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 방사선 방어 물질을 처리하고, 방사선을 조사하는 단계를 포함할 수 있다.
- [9] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 처리되는 방사선 방어 물질은 코발트 60(Co^{60})이고, 조사되는 방사선은 12 내지 50 킬로그레이(kGy) 범위 중 선택되는 감마선일 수 있다.
- [10] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 트립신, 콜라게나제 및 프로테아제를 포함하는 효소 용액을 처리하는 것일 수 있다.
- [11] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리한 후 생리학적 염수로 수세 처리하여 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [12] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리한 후 생리학적 염수로 수세 처리한 후 증류수와 함께 삼투 처리하여 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [13] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 하나 이상의 포어를 형성하는 단계에 있어서, 상기 포어는 1 내지 1000 마이크로미터(μm) 범위 중 선택되는 크기를 가질 수 있다.
- [14] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 자가 줄기 세포의 주입 단계는 상기 자가 줄기 세포의 주입 전에 또는 동시에 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계는 상기 동종 연조직 지지체에 물리적 자극을 제공하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [16] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 물리적 자극은 초당 1회 이하의 빈도로 상기 동종 연조직 지지체에 제공될 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 물리적 자극의 제공은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극을 제공하거나, 상기 동종 연조직 지지체의 세로 축을 기준으로 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림을 제공하거나, 또는 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극을 제공함과 동시에 상기 동종 연조직 지지체의 세로 축을 기준으로 상기 동종 연조직

지지체의 양 가로 방향으로 비틀림을 제공하는 것일 수 있다.

- [18] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극을 제공하는 것은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단을 길이 방향으로 연장하되, 일 말단을 상기 동종 연조직 지지체의 전체 길이 대비 10% 이하 범위로 연장함과 동시에 다른 말단을 상기 동종 연조직 지지체의 전체 길이 대비 10% 이하 범위로 연장하는 것일 수 있다.

- [19] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림을 제공하는 것은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단을 회전시키되, 일 말단을 시계 방향으로 45도 이하 범위로 회전시킴과 동시에 다른 말단을 반시계 방향으로 45도 이하 범위로 회전시키는 것일 수 있다.

- [20] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 배양 단계는 7일 이하 범위에서 진행할 수 있다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 동종 연조직 이식체 제조 방법에 따르면, 동종 생물체로부터 유래된 동종 연조직 지지체에 자가 줄기 세포를 주입하여 배양함으로써 인체의 손상된 연조직을 효율적으로 대체할 수 있는 동종 연조직 이식체를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법을 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.
- [23] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 지지체 세척 및 살균 단계를 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.
- [24] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계를 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.
- [25] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 포어 형성 단계를 구현하기 위한 방법을 도시한다.
- [26] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 자가 줄기 세포 주입 단계를 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.
- [27] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 동종 연조직 지지체 배양 단계에서 물리적 자극을 제공하는 단계를 도시한다.
- [28] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 경골건의 clearant process 처리 전 후의 인장 강도 측정 결과를 도시한다.
- [29] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 인간 및 돼지의 경골건의 일반적인 방사선 조사 및 clearant process 처리 후 방사선 조사에 따른 인장강도 측정 결과를 도시한다.
- [30] 도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계의 전과 후의 동종 연조직 지지체의 표면과 단면의 SEM(scanning electron microscope) 사진을 도시한다.

- [31] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계의 전과 후의 동종 연조직 지지체의 단면의 hematoxylin & eosin 염색 사진을 도시한다.
- [32] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포 처리 전 후 돼지 경골건의 DNA 잔류량 측정 결과를 도시한다.
- [33] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포 1×10^5 , 2×10^5 및 5×10^5 cells/cm² 농도별 (A) 줄기세포 담지 콜라겐 겔 (0.5%) 및 (B) 줄기세포 담지 콜라겐 겔 (1.0%) 배양 1, 3, 7일차 세포 증식율 측정 결과를 도시한다.
- [34] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 생체배양기에서 물리적 자극 전 후 줄기세포 담지 겔 이식 경골건의 Real time PCR 분석 결과를 도시한다.
- [35] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 줄기세포 담지 겔 이식군의 GAG 함량 분석 결과를 도시한다.
- [36] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 줄기세포 담지 겔 이식군의 콜라겐 함량 분석 결과를 도시한다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 일 실시예를 상세하게 설명한다. 이하 설명은 본 발명의 일 실시예들을 용이하게 이해하기 위한 수단일 뿐이며, 본 발명의 보호범위를 제한하기 위한 것은 아니다.
- [38]
- [39] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 지지체 제조 방법을 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은 인간 또는 동물의 몸체로부터 획득된 동종 연조직 지지체를 획득하는 단계(100); 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계(200); 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리하여 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계(300); 상기 면역 거부 반응 세포가 제거된 동종 연조직 지지체에 하나 이상의 포어를 형성하는 단계(400); 상기 형성된 포어에 사용자의 자가 줄기 세포를 주입하는 단계(500); 및 상기 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계(600)를 포함한다.
- [41]
- [42] 도 1에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은 제1 단계로서, 인간 또는 동물의 몸체로부터 획득된 동종 연조직 지지체를 획득하는 단계(100)를 포함한다. 상기 연조직(soft tissue)은 일반적으로 뼈가 아닌 몸체 내 조직으로서 몸체의 기관 또는 다른 구조물을 연결하거나 또는 지지하거나 또는 둘러싸는 조직을 말하고, 예를 들어, 인대, 힘줄, 아킬레스 건, 티비아리스 건 등이 있다. 상기 연조직은 주로 몸체의 무게를 지탱하거나 유지하는 부위에 분포되어 있고, 반복적인 움직임, 예를 들어 굽힘, 꼬임, 회전

등을 지지하고 유지하는 역할을 한다. 상기 연조직은 몸체의 운동과 관련성이 크기 때문에 상기 연조직 또는 이와 관련된 해당 몸체 부위에 이상이 생길 경우 운동 계통에 치명적인 질환을 야기할 수 있다. 한편, 상기 동종이라 함은 동일 개체 또는 의학적으로 동종 개체로 인정될 수 있는 관계를 말한다. 따라서 본 발명에 따른 동종 연조직 이식체(soft tissue homograft)는 동일 개체간 또는 의학적으로 인정되는 동종 개체간 상호 이식될 수 있는 연조직을 포함하는 이식체를 말한다. 상기 동종 연조직 지지체(support)는 자기의 몸체로부터 직접 분리되거나 또는 의료학적으로 인정되는 동종 개체로부터 분리되어 획득된 몸체의 일 구조물로서 해당 치료 부위에 대체되는 지지물을 말한다. 또한, 상기 동종 연조직 지지체는 기증된 시신으로부터 합법적으로 채취될 수도 있다. 상기 동종 연조직 지지체는 몸체로부터 분리된 구조물 그 자체일 수도 있지만, 적절한 이식을 위해 다른 몸체 구조물과 조합될 수도 있다. 예를 들어, 상기 동종 연조직 지지체는 인대 그 자체일 수도 있지만, 하나 이상의 뼈 단편과 연결된 구조물, 예를 들어 뼈 단편-인대 복합 구조물 또는 뼈 단편-인대-뼈 단편 복합 구조물일 수도 있다. 또한, 상기 동종 연조직 지지체는 이식되는 몸체 부위에 따라 다양한 크기 및/또는 형상으로 구현될 수 있다.

[43] 도 1에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은 제2 단계로서, 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계(200)를 포함한다. 상기 동종 연조직 이식체가 다른 몸체에 합병증 등 부작용없이 이식되기 위해서는 상기 인체 또는 동물의 몸체로부터 획득된 동종 연조직 지지체가 포함하고 있는 이물질뿐만 아니라 유해한 세균 등은 가능한 완전히 제거되어야 한다. 본 발명에 따른 세척 및 살균 단계(200)는 다양한 물리적 또는 화학적 방법으로 각각 구현될 수 있으나, 상기 물리적인 방법뿐만 아니라 상기 화학적인 방법을 동시에 적용하는 것이 바람직하다. 상기 세척 및 살균 단계(200)는 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 물리적 및/또는 화학적으로 세척 및 살균하기 위한 다양한 방법으로 구현될 수 있으나, 상세한 설명은 이하, 도 2에서 설명한다.

[44] 도 1에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은 제3 단계로서, 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리하여 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계(300)를 포함한다. 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 효소 용액을 처리하여 구현된다. 상기 효소 용액은 상기 동종 연조직 지지체를 획득한 이식 전 인간 또는 동물의 몸체에 존재하는 고유의 세포를 제거하기 위해 사용된다. 상기 이식 전 인간 또는 동물의 몸체에 존재하는 고유의 세포들은 다른 인간 또는 동물의 몸체의 면역 계통에 대해 항원(antigen)으로 작용할 수 있다. 이 경우 이식된 몸체 내에서 다양한 면역 반응을 야기하고, 이러한 면역 반응이 일어나는 과정에서 근육 통증 또는 위축 등으로 인해 예상치 못한 부작용이 발생할 수 있다. 따라서, 상기 동종 연조직 이식체에 포함된 고유 세포들을 제거할 수 있는 다양한 효소를 처리하여 상기

면역 거부 반응을 억제해야 할 필요성이 있다. 상기 효소 용액을 처리하여 면역 거부 반응 세포를 제거하는 것은 다양한 방법으로 구현될 수 있으나, 상세한 설명은 이하, 도 3에서 설명한다.

- [45] 도 1에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은 제4 단계로서, 상기 면역 거부 반응 세포가 제거된 동종 연조직 지지체에 하나 이상의 포어를 형성하는 단계(400)를 포함한다. 상기 포어(pore)는 이하 설명될 자가 줄기 세포가 담지되는 부분이다. 상기 포어는 상기 동종 연조직 지지체에 극세사침을 적용함으로써 형성된다. 도 4에 따르면, 상기 제3 단계에 의해 면역 거부 반응 세포가 제거된 동종 연조직 지지체(10) 표면은 극세사침(420, 예를 들어 M100SWBL 모델, 대한민국)에 의해 자극받아 1 이상의 포어(410)가 형성된다. 상기 포어(410)의 크기(직경)는 약 1 내지 약 1000 마이크로미터(μm) 범위 중 선택될 수 있고, 약 10 마이크로미터(μm)의 크기(직경)로 형성되는 것이 바람직하다. 상기 포어(410)의 수는 특별히 제한되지 않지만, 상기 동종 연조직 지지체(10) 표면적 내에 가능한 많은 수의 포어가 형성되는 것이 바람직하다. 상기 포어(410)가 형성된 후, 이하 설명될 자가 줄기 세포가 도입되기 전 또는 후에 상기 자가 줄기 세포가 적절하게 정착하기 위한 물질이 추가로 도입될 수 있다. 상기 추가로 도입되는 물질은 성장 요소(growth factor) 등을 포함할 수 있다.
- [46] 도 1에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은 제5 단계로서, 상기 형성된 포어에 사용자의 자가 줄기 세포를 주입하는 단계(500)를 포함한다. 상기 자가 줄기 세포는 이식받는 몸체에 존재하는 줄기 세포를 말한다. 상기 줄기 세포(stem cell)는 일반적으로 특정한 세포로 분화가 진행되지 않은 상태로 유지되다가 필요한 경우 신경, 혈액, 연골 등 몸체를 구성하는 다양한 종류의 세포로 분화될 가능성을 갖는 세포로 정의된다. 상기 줄기 세포는 현재 재생 의학(regenerative medicine) 분야에서 다양하게 활용되고 있고, 고전적인 약물 치료법이나 수술 치료법을 순차적으로 대체하거나 보완하고 있는 실정이다. 특히, 성체 줄기 세포(adult stem cell)는 몸체에 존재하는 특정 조직을 구성하는 세포로서, 몸체 속에 미량으로 존재하면서 몸체가 외부적인 영향을 받은 경우 정상 상태를 유지할 수 있도록 최소한의 세포를 제공해 주는 역할을 수행한다. 특히 상기 성체 줄기 세포는 장기 재생을 위한 이식 분야에서 면역 거부 반응이 미미하거나 존재하지 않기 때문에 자가 이식이 가능하다는 장점이 있다. 본 발명에 따른 자가 줄기 세포는 이식받고자 하는 몸체의 다양한 줄기 세포를 이용할 수 있으나, 이식받고자 하는 몸체의 골수로부터 획득한 자가 줄기 세포를 이용하는 것이 바람직하다. 상기 자가 줄기 세포는 상기 제4 단계에서 형성된 포어에 주입되어 이하 설명될 배양 단계에서 상기 동종 연조직 지지체와 함께 적절한 조건으로 배양되어 동종 연조직 이식체가 된다.
- [47] 도 1에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법은

제6 단계로서, 상기 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계(600)를 포함한다. 상기 배양 단계(600)는 상기 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 지지체가 최적의 이식 조건을 갖춘 동종 연조직 이식체가 될 수 있도록 적절한 조건에서 구현된다. 이 경우 상기 적절한 조건은 적정 온도, 적정 압력, 적정 기간 등이 고려될 수 있다. 한편, 상기 배양 단계(600)는 상기 동종 연조직 지지체에 물리적 자극을 제공하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 물리적 자극 제공 단계는 이하, 도 6에서 상세하게 설명한다.

[48]

[49] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 지지체 제조 방법에 포함된 지지체 세척 및 살균 단계를 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.

[50] 도 2에 따르면, 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계(200)는 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고, 초음파를 적용하는 단계(210)를 포함할 수 있고, 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 방사선 방어 물질(radioprotectant)을 처리하고, 방사선을 조사하는 단계(220)를 포함할 수 있다.

[51] 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고 초음파를 적용하는 단계(200)에 의해, 상기 동종 연조직 지지체에 대한 화학적인 세척살균 효과뿐만 아니라 물리적인 세척살균 효과도 얻을 수 있다. 한편, 상기 과산화수소 처리 및 초음파 적용 단계(200)는 특정 영역에서 상기 동종 연조직 지지체의 물성, 예를 들어 인장 강도(tensile strength) 등의 강화에도 기여할 수 있다. 예를 들어, 인체로부터 획득된 인대에 약 0.1 내지 약 5.0 퍼센트(%) 농도 범위의 과산화수소를 처리하고 약 120 내지 약 400 와트(W) 출력 범위의 초음파를 적용한 결과, 인대의 인장 강도가 증가하는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고 초음파를 적용하는 단계(200)에 있어서, 상기 처리되는 과산화수소는 0.1 내지 5.0 퍼센트(%) 농도 범위 중 선택되는 농도를 갖고 상기 적용되는 초음파는 120 내지 400 와트(W) 범위 중 선택되는 출력을 갖는 것이 바람직하고, 특히 상기 처리되는 과산화수소는 0.5% 퍼센트(%) 농도 범위를 갖고 상기 적용되는 초음파는 120 와트(W) 출력을 갖는 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 방사선 방어 물질을 처리하고, 방사선을 조사하는 단계(220)에 의해 살균 효과를 극대화할 수 있다. 통상적으로 방사선을 조사하여 상기 동종 연조직 지지체를 살균할 수도 있으나, 상기 방사선 방어 물질을 사용함으로써, 방사선에 의해 악영향을 최소화시킬 수 있다. 상기 처리되는 방사선 방어 물질은 다양할 수 있으나, 바람직하게는 코발트 60(^{60}Co)이고, 조사되는 방사선은 다양한 범위 내에서 선택될 수 있으나, 바람직하게는 12 내지 50 킬로그레이(kGy) 범위 중 선택되는 감마선이다. 한편, 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계(200)에 있어서, 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고, 초음파를 적용하는 단계(210)와 상기 방사선 방어 물질을 처리하고,

방사선을 조사하는 단계(220)는 개별적으로 적용될 수 있을 뿐만 아니라 함께 적용될 수도 있다. 이 경우 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계(200)에 있어서, 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고, 초음파를 적용하는 단계(210) 후, 뒤이어 상기 방사선 방어 물질을 처리하고, 방사선을 조사하는 단계(220)를 적용하는 것이 바람직하다.

[52]

[53] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 지지체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계를 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.

[54] 도 3에 따르면, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계(300)는 효소 용액을 처리하는 단계(310) 및/또는 염수(saline)로 수세 처리하는 단계(320)를 포함한다. 상기 효소 용액은 면역 거부 반응 세포를 제거하기 위한 다양한 효소를 포함할 수 있으나, 바람직하게는 트립신(trypsin), 콜라게나제(collagenase) 및 프로테아제(protease)를 포함한다. 예를 들어, 효소 용액은 약 0.25% 트립신(0.02% EDTA, invitrogen Corp., USA), 약 3 mg 콜라게나제 A(0.15 U/mg, Sigma aldrich, USA) 및 약 15 mg 프로테아제(4.8 U/mg, Sigma aldrich, USA)를 포함할 수 있고, 상기 효소 용액은 상기 동종 연조직 지지체에 약 4시간 동안 약 37 °C, 약 120 rpm 하에서 약 40 ml 용액으로 교반 처리될 수 있다(Shaking incubator 사용, 엔바이오텍, 대한민국). 한편, 상기 염수로 수세 처리하는 단계(320)는 잔류하는 효소 용액을 제거하기 위한 세척을 위함이다. 따라서, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계(300)는 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리(310)한 후 추가적으로 생리학적 염수로 수세 처리(320)하여 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계(300)는 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리(310)한 후 생리학적 염수로 수세 처리(320)한 후 증류수와 함께 삼투 처리(330)하여 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다. 그러나, 상기 생리학적 염수는 세척 용도로 사용되는 것이므로, 상기 생리학적 염수의 구성물의 함량, 염도 등은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 생리학적 염수는 상기 동종 연조직 지지체에 약 4 °C, 약 120 rpm 하에서 약 40 ml 용액으로 처리될 수 있고, 약 1분간 3회 반복 처리된 후 약 12시간 동안 연속 처리될 수 있다. 이 경우 상기 생리학적 염수로 수세 처리한 후 증류수와 함께 삼투 처리(Osmotic treatment)될 수 있고, 예를 들어 약 5분간 약 240 와트(W) 출력으로 초음파 처리(Ultrasonication)될 수 있다(Ultra sonicator 사용, 바이오프리, 대한민국). 도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계 전의 동종 연조직 지지체의 표면과 단면의 SEM(scanning electron microscope) 사진이고, 도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계 후의 동종 연조직 지지체의 표면과 단면의 SEM(scanning electron microscope) 사진이다. 또한, 도 10a는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조

방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계 전의 동종 연조직 지지체의 단면의 hematoxylin & eosin 염색 사진이고, 도 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 이식체 제조 방법에 포함된 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계 후의 동종 연조직 지지체의 단면의 hematoxylin & eosin 염색 사진이다. 도 9b 및 도 10b에 따르면, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계에 의해 동종 연조직 이식체의 세포가 제거된 것을 확인할 수 있다.

[55]

[56] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 지지체 제조 방법에 포함된 자가 줄기 세포 주입 단계를 구현하기 위한 개별 단계를 도시한다.

[57] 도 5에 따르면, 상기 형성된 포어에 사용자의 자가 줄기 세포를 주입하는 단계(500)는 상기 자가 줄기 세포의 주입(520)) 전에 또는 동시에 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질을 주입하는 단계(510)를 더 포함할 수 있다. 상기 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질은 콜라겐, 젤라틴, BMP2, BMP4, BMP7, PDGF, TGF-beta 등과 같이 뼈에 존재하는 수용성 단백질을 함유한 액체를 고농도로 농축 및 동결건조한 후 재수화를 통해 일정한 점성을 가진 액체로 재구성한 물질로서, 상기 포어에 주입되는 자가 줄기 세포가 상기 동종 연조직 지지체에 적절하게 정착되도록 유도할 수 있다. 상기 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질은 외부 물질의 추가 없이 순수하게 인체의 뼈로부터 제조된 것이기 때문에 이식되는 몸체에 대한 면역 거부 반응이 전혀 없으며, 생리활성형이다. 따라서, 상기 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질을 추가 주입하면 자가 줄기 세포가 상기 동종 연조직 지지체에서 현저한 골 유도 능력 및 골 전도 능력을 보이고, 콜라겐 성분에 의해 점성을 유지함으로써 몸체에 쉽게 적응하게 된다.

[58]

[59] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 동종 연조직 지지체 제조 방법에 포함된 동종 연조직 지지체 배양 단계에서 물리적 자극을 제공하는 단계를 도시한다.

[60] 도 6에 따르면, 상기 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계(600)는 상기 동종 연조직 지지체에 물리적 자극을 제공하는 단계(610)를 더 포함한다. 이미 설명된 바와 같이, 몸체에 존재하는 연조직은 주로 몸체의 무게를 지탱하거나 유지하는 부위에 분포되고 반복적인 움직임, 예를 들어 굽힘, 꼬임, 회전 등을 지지하고 유지하는 역할을 수행하기 때문에 다양한 외부적 자극을 받게 된다. 상기 물리적 자극의 제공에 의해, 상기 다양한 외부적 자극을 이식되는 동종 연조직 이식체에 가함으로써 상기 동종 연조직 이식체가 이식된 몸체 내에서 효율적으로 조직 분화가 일어나서 이식된 몸체 본연의 조직으로 쉽게 융화될 수 있도록 한다. 따라서, 상기 물리적 자극은 몸체에 존재하는 연조직에 가하여진 자극과 유사하도록 다양하게 구현될 수 있으나, 바람직하게는 운동 자극과 관련하여, 비틀림 및/또는 인장 자극일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 물리적 자극의 제공(610)은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극(611)을 제공하거나, 상기 동종 연조직 지지체의

세로 축을 기준으로 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림(612)을 제공하거나, 또는 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극(611)을 제공함과 동시에 상기 동종 연조직 지지체의 세로 축을 기준으로 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림(612)을 제공하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극(611)을 제공하는 것은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단을 길이 방향으로 연장하되, 일 말단을 상기 동종 연조직 지지체의 전체 길이 대비 10% 이하 범위로 연장함과 동시에 다른 말단을 상기 동종 연조직 지지체의 전체 길이 대비 10% 이하 범위로 연장하는 것일 수 있고, 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림(612)을 제공하는 것은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단을 회전시키되, 일 말단을 시계 방향으로 45도 이하 범위로 회전시킴과 동시에 다른 말단을 반시계 방향으로 45도 이하 범위로 회전시키는 것일 수 있다. 또한, 상기 인장 자극(611) 및/또는 비틀림 자극(612)을 포함하는 물리적 자극은 다양한 빈도로 제공될 수 있으나, 초당 1회 이하의 빈도(frequency)로 제공되는 것이 바람직하다. 한편, 상기 물리적 자극 제공 단계(610)를 포함하는 배양 단계(600)는 다양한 기간 동안 진행될 수 있으나, 바람직하게는 약 7일 이하의 범위 내에서 진행될 수 있다. 상기 물리적 자극의 제공 단계에 따라, 상기 동종 연조직 지지체가 인체의 정상 조직과 유사한 강도를 구비할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 돼지의 인대 조직을 획득하여 실험하였다. 상기 돼지의 인대 조직에 약 10%의 인장 자극(양 말단을 약 5%로 당김) 및 약 90도의 비틀림 자극(일 말단을 시계 방향으로 약 45도, 다른 말단을 반시계 방향으로 약 45도로 회전)을 초당 1회의 빈도로 1일, 4일 및 7일 동안 제공하여 각각의 강도를 측정하였다. 그 결과, 최대 강도값(maximum load, 뉴턴(N))은 아무런 자극을 제공하지 않은 대조군의 경우 약 354.9 뉴턴(N), 1일 동안 자극을 제공한 실험군의 경우 약 380.8 뉴턴(N), 4일 동안 자극을 제공한 실험군의 경우 약 418.6 뉴턴(N), 7일 동안 자극을 제공한 실험군의 경우 약 818.1 뉴턴(N)으로 측정되었다. 상기 결과 값을 통해 인장 자극과 비틀림 자극을 지속적으로 제공받은 돼지 인대 조직은 인체의 정상 조직과 유사한 강도에 매우 근접한 수치까지 도달할 수 있음을 확인하였다.

[61]

[62] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 생체배양기에서 물리적 자극 전 후 줄기세포 담지젤 이식 경골건의 Real time PCR 분석 결과를 도시한다.

[63] 구체적으로, 생체배양기 내에서 1, 3, 7일간 물리적 자극을 준 줄기세포 담지젤 이식 경골건의 collagen type I, type III 및 tenascin-c gene의 Real time PCR을 분석한 결과이다. collagen type I gene은 1일차 및 7일차의 경우 0.11 ± 0.01 및 0.34 ± 0.02 으로 3배 증가하였다. collagen III gene은 1일차 및 7일차의 경우 0.31 ± 0.01 및 0.67 ± 0.03 으로 2.2배 증가하였다. Tenascin-C는 1일차 및 7일차의 경우 0.42 ± 0.01 및 0.79 ± 0.02 으로 1.9배 증가하였다. 인대 조직의 대표적인 표식자인 tenascin-C의 증가를 확인하였고, 이를 통하여 물리적으로 자극한

인간골수 유래 중간엽 줄기세포가 인대조직으로 분화되었음을 확인하였다.

[64]

[65] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 줄기세포 담지젤 이식군의 GAG 함량 분석 결과를 도시한다.

[66] 구체적으로, 돼지 경골건 표면에 접종한 줄기세포 담지젤 이식군 (5×10^5 cell/cm²)을 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 군과 물리적 자극을 주지 않은 군의 배지에서 분비한 GAG의 함량 분석을 진행하였다. 1, 3, 7일간 배양한 배양액을 모은 후 GAG assay kit을 이용하여 656 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 chondroitin-4-sulfate 곡선의 선형 회귀분석 값은 99.9%의 결과가 나왔다. 물리적 자극을 준 군이 주지 않은 군보다 높은 GAG 함량을 보였고, 물리적 자극을 주지 않은 군은 1일째에 14.187 ± 0.080 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3일째는 25.542 ± 0.599 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7일째는 36.346 ± 0.843 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 물리적 자극 1일째는 14.986 ± 0.765 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3일째는 33.298 ± 0.936 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7일째는 44.791 ± 0.087 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 증가되는 양상을 보였다. 결과적으로 7일간 물리적 자극을 주고 배양된 줄기세포 담지젤 이식군은 자극을 주지 않은 군 보다 약 23% 증가하였다.

[67]

[68] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 줄기세포 담지젤 이식군의 콜라겐 함량 분석 결과를 도시한다.

[69] 구체적으로, 돼지 경골건 표면에 접종한 줄기세포 담지젤 이식군 (5×10^5 cell/cm²)을 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 군과 물리적 자극을 주지 않은 군의 배지에서 분비한 collagen의 함량 분석을 진행하였다. 1, 3, 7일간 배양한 배양액을 모은 후 collagen assay kit을 이용하여 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 collagen 곡선의 선형 회귀분석 값은 99.9%의 결과가 나왔다. 물리적 자극을 준 군이 주지 않은 군보다 높은 collagen 함량을 보였고, 물리적 자극을 주지 않은 군은 1일째에 0.769 ± 0.012 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3일째는 0.949 ± 0.052 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7일째는 1.382 ± 0.028 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 물리적 자극 1일째는 0.811 ± 0.106 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 3일째는 1.218 ± 0.072 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 7일째는 1.803 ± 0.065 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 증가되는 양상을 보였다. 결과적으로 7일간 물리적 자극을 주고 배양된 줄기세포 담지젤 이식군은 자극을 주지 않은 군 보다 약 30% 증가하였다.

발명의 실시를 위한 형태

[70] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[71]

[72] **실험예 1: 동종 연조직 지지체의 멸균**

[73] 연조직 지지체를 수득하기 위하여, 돼지의 슬개골 및 경골을 수득하였다. 수득한 연조직 지지체를 화학적 약품을 조직에 처리한 후, 고선량의 감마선 멸균

작업을 하는 Clearant Process®(US2005/6,908,591B2)을 이용하여 멸균하였다. 구체적인 방법은 하기와 같다.

- [74] 16.2% 프로필렌 글리콜, 22.1% DMSO, 2.7% 만니톨 및 3.8% 테트라할로오스 및 60.0% 정제수를 혼합하여 방사선 보호 용액을 제조하였다. 멸균할 동종 건을 멸균 pouch에 넣고, 조직의 무게에 비례하여 제조된 용액을 넣은 후 열 접합 포장을 하였다. Clearant Process® 공정에 맞춰 약품 처리를 한 후, 조직의 수분을 멸균 타올로 제거(수분 잔류량 20~30%)한 후, 동결건조 보관용 조직은 동결 건조 처리를 하고, 냉동보관용 조직은 포장 후 냉동 보관하였다. 조직을 약품 처리하는데 걸리는 총소요시간은 25시간이며, 이후 동결 건조 보관용 조직의 경우 24시간이 추가로 소요되었다. 또한 감마선(0, 25, 50 KGy)에서 멸균 처리를 하였다. Clearant를 처리한 후 방사선을 조사한 골이 일반적인 방사선 조사를 한 경우에 비하여 인장강도가 증가함을 확인하였다.

[75]

[76] 실험예 2: 동종 연조직 지지체의 면역거부반응 억제

[77] <실험예 2-1> 면역거부반응 억제를 위한 연조직 지지체의 탈세포화

[78] 세척 및 살균 과정을 거친 연조직 지지체에서 세포성분에 대한 조직 항원을 없애기 위한 탈세포화 과정을 수행하였다. 탈세포화 과정은 효소용액 처리, 수세 처리 및 삼투 처리를 이용하여 진행하였으며, 구체적인 방법은 다음과 같다.

[79] 효소용액 처리를 위해 -70 °C 딥 프리저에서 냉동한 돼지 경골건 (길이 12 cm, 너비 1 cm)을 꺼낸 후 멸균 증류수에 넣고, water bath (DongA, KOREA)에서 37 °C조건으로 30분간 해동시켰다. 해동 시킨 후 효소 칵테일 용액(enzyme cocktail solution) [0.25% 트립신 (T4049, SIGMA, USA) 500 ml, 콜라게나제 A (C0130, SIGMA, USA) 37.5 ml, 프로테아제 (P4630, SIGMA, USA) 187.5] 500 ml이 들어있는 1,000 ml 비이커에 경골건 10개를 넣고, 셰이커 인큐베이터(shaker incubator)(NB-205V, N-BIOTEK, KOREA)에서 120 rpm, 37 °C조건으로 4시간 동안 교반하였다.

[80] 수세 처리를 위해 4시간 후 효소 칵테일 용액을 제거하고, 생리식염수 500 ml를 첨가하였다. 그 후 셰이커 인큐베이터에서 120 rpm, 4 °C조건으로 1시간 동안 교반하여 세척하였다. 이 과정을 3번 반복하였고, 마지막 세척과정은 12시간 동안 진행하였다.

[81] 삼투 처리를 위해 12시간 후 생리식염수를 제거하고, 멸균 증류수 500 ml를 첨가하였다. 그 후 초음파 기기를 이용하여 240w 조건으로 5분간 처리하였다. 멸균 증류수를 제거하고, 생리식염수 500 ml을 넣고 초음파 기기를 이용하여 240w 조건으로 5분간 처리하였다.

[82]

[83] <실험예 2-2> 탈세포화된 지지체의 주사전자현미경 촬영

[84] 돼지 경골건의 탈세포 처리 전후 조직의 외관 형태는 주사전자현미경 (5kV, JSM-6380, Jeol Inc., JAPAN) 촬영을 통하여 확인하였다. 구체적인 방법은 하기와

같다. 상기에서 수득한 세척 및 멸균된 돼지 경골 건을 1 M 인산 염 완충용액 (70011, GIBCO, USA, pH 7.4)으로 수세하였다. 그 후 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)(340855, SIGMA, USA) 용액을 넣어 고정 시킨 후 4 °C에서 24시간 동안 고정하였다. 멸균된 PBS로 수세한 후 알코올의 농도를 50, 70, 80, 90, 100 %로 높여 1시간씩 진행 후 탈수시켰다. 탈수 시킨 조직을 항습도 조절기 (Dry keeper, Sanplatec, JAPAN)에 넣고 상온에서 건조시켰다. 건조된 조직을 양면테이프를 이용하여 시편 고정대에 고정시킨 후, 플라즈마 스퍼터를 이용하여 200 Å 두께의 백금을 코팅하였다. 그 후 저 배율의 주사전자현미경을 이용하여 조직의 외관 형태를 30 및 300 배로 관찰하였다.

[85]

[86] <실험예 2-3> 탈세포화된 지지체의 조직학적 염색

[87] 조직 내 분포하고 있는 세포 핵 및 세포질을 헤마토실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)으로 염색하여 탈세포 처리 전 후 경골건 내에 존재하는 세포의 분포 양상과 세포의 외관모습을 확인하였다. 구체적인 실험 방법은 하기와 같다.

[88] 조직 염색 전처리를 다음과 같이 수행하였다. 조직프로세스 (STP 120, Thermo scientific, USA) 장비를 이용하여 다음과 같은 프로그램 조건으로 시행하였다.

[89] 표 1

[Table 1]

시약용기 No.	시약(Reagent)	담금시간(Immersion Time) 시간:분	교반 조건(Stirring ate)	
			rpm.	프로그램된 값 (Programed value)
1	Formalin	12:00	60	1
2	Formalin	12:00	60	1
3	Alcohol 70%	01:30	60	1
4	Alcohol 80%	01:30	60	1
5	Alcohol 95%	01:30	60	1
6	Alcohol 100%	01:00	60	1
7	Alcohol 100%	01:00	60	1
8	Alcohol 100%	01:00	60	1
9	Xylene	01:30	60	1
10	Xylene	01:30	60	1
11	Paraffin	02:00	60	1
12	Paraffin	02:00	60	1

[90]

[91] 조직 블록시편을 제작하기 위하여, 파라핀 용액에 침투시킨 조직을 티슈 임베딩 시스템(tissue embedding system)(Histocentre 3, Thermo, USA)의 열판(hot plate)에 몰드 베이스(mold base)를 얹고, 먼저 파라핀을 약간 부은 상태에서 조직을 넣었다. 그 후에 파라핀을 다 채웠다. 티슈 임베딩 시스템의 냉판(cold plate)에 파라핀블록을 얹어 10분간 굳힌 후 몰드 베이스를 제거하고 상온 보관하였다.

[92] 조직슬라이드를 제작하기 위하여, 조직 절편기 (Finess met, Thermo, USA)과 마이크로톰 블레이드(microtome blade)를 이용하여 10 μm 로 트리밍 작업을 진행하고 4 μm 두께로 조직 절편을 만들었다. 수돗물이 담긴 용기에 띄우고, 슬라이드로 건져 예열된 water bath에 띄운 후 각각의 슬라이드에 조직절편을 부착하고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 건조하였다.

[93] 그 후, H&E 염색을 수행하였다. 구체적인 염색 방법은 하기와 같다.

[94] 탈 파라핀 과정을 수행하기 위하여, 자일렌(xylene)이 담긴 유리 염색 용기(glass

stain jar)에 조직 슬라이드를 10분간 3번 담갔다. 합수 과정을 수행하기 위하여, 알콜 99.9%가 담긴 첫 번째 유리 염색 용기에 조직 슬라이드를 5분간 담갔다. 알콜 99.9 %가 담긴 두 번째 유리 염색 용기에 조직 슬라이드를 5분간 옮겨 담갔다. 알콜 95 %가 담긴 두 번째 유리 염색 용기에 조직 슬라이드를 3분간 옮겨 담갔다. 알콜 80 %가 담긴 두 번째 유리 염색 용기에 조직 슬라이드를 3분간 옮겨 담갔다. 알콜 70%가 담긴 두 번째 유리 염색 용기에 조직 슬라이드를 3분간 옮겨 담갔다. 흐르는 수돗물에 1분간 옮겨 담갔다.

[95] 핵염색 과정을 수행하기 위하여, 해리스 헤마토실린(Harris hematoxylin)에 10분간 옮겨 담군 후 흐르는 수돗물에 3분간 옮겨 담갔다.

[96] 탈색 과정을 수행하기 위하여, 1% 알코올성 HCl(alcoholic HCl)이 담긴 유리 염색 용기에 3번 두드린 후(tapping), 흐르는 수돗물에 3분간 옮겨 담갔다. 중화 과정을 위하여, 1% 암모니아수(ammonia water)가 담긴 유리 염색 용기에 1분간 옮겨 담군 후 흐르는 수돗물에 3분간 옮겨 담갔다. 세포질염색 과정을 수행하기 위하여, 에오신에 1분간 옮겨 담갔다. 그 후, 70% 알콜이 담긴 유리 염색 용기에 3번 두드려 탈수하였다. 그 후, 깨끗한 자일렌이 담긴 유리 염색 용기에 조직 슬라이드를 15분간 담갔다. 그 후, 포셉을 이용하여 자일렌에 담겨있는 조직 슬라이드 위에 마운트(mount) 용액 한 방울을 떨어뜨리고 커버 글라스를 덮고, 현미경으로 촬영하였다.

[97]

[98] <실험예 2-4> 탈세포화된 지지체의 DNA 잔류량 측정

[99] 탈세포 처리 전후 돼지 경골건을 -20 °C에서 24시간 동안 동결시키고, 동결건조기를 이용하여 수분을 제거하였다. 그 후, 잔류 세포의 양을 확인하기 위하여 잔류 DNA를 검사하였다.

[100] DNA 정량은 DNEasy kit (69506-250, Qiagen, USA)을 사용하여 측정하였다. 구체적인 방법은 하기와 같다. 탈세포 처리 전후 동결건조 조직 25 mg을 1.5 ml 마이크로 원심분리 튜브에 넣은 후, ATL buffer 180 μ l를 첨가하였다. Proteinase K 20 μ l을 튜브에 첨가하고, 교반 후 조직이 완전히 분해될 때까지 열 블럭(heating block)에서 55 °C조건으로 정치하였다(2시간 마다 교반을 진행함). 분해가 된 것을 확인 후 15초간 볼텍스 혼합기(vortex mixer)를 이용하여 혼합하였다. 튜브에 AL buffer 200 μ l를 첨가하고 볼텍스 혼합기를 이용하여 혼합하고 열 블럭에서 70 °C 조건으로 10분간 정치하였다. 튜브에 99.9% 알콜 200 μ l를 첨가하고 볼텍스 혼합기를 이용하여 혼합하였다. 혼합된 시료를 2 ml 수집 튜브(collection tube)에 결합된 DNeasy 스핀 컬럼에 넣고, 원심분리 (8,000 rpm)를 1분간 진행하여, 수집 튜브에 여과된 액은 제거하였다. 2 ml 수집 튜브에 결합된 DNeasy 스핀 컬럼에 AW1 buffer 500 μ l를 첨가하고, 원심분리 (8,000 rpm)를 1분간 진행하여, 수집 튜브에 여과된 액은 제거하였다. 2 ml 수집 튜브에 결합된 DNeasy 스핀 컬럼에 AW2 buffer 500 μ l를 첨가하고, DNeasy 멤브레인이 완전히 건조될 수 있도록 원심분리 (17,000 rpm)를 3분간 진행하였다. DNeasy

스핀 컬럼에 접촉된 액을 확인하고, 접촉 했을 경우 원심분리 (17,000 rpm)를 1분간 더 진행하였다. 새로운 1.5 ml 마이크로 원심분리 튜브에 DNeasy 멤브레인이 건조된 DNeasy 스핀 컬럼을 결합하고, AE buffer 200 μ l를 첨가하여 상온에서 1분간 정치하였다. 그 후 원심분리 (8,000 rpm)를 1분간 진행하여, 1.5 ml 마이크로 원심분리 튜브에 용출한 액을 사용하였다. 용출된 액을 Nanodrop (nanodrop 2000, thermo, USA)의 DNA 정량프로그램을 이용하여 측정하였다. 그 결과는 하기와 같이, 탈세포 단계를 수행한 경골견에서는 DNA의 잔류량이 현저히 낮음을 확인하였다.

[101] 표 2

[Table 2]

샘플	DNA 잔류량(ng/mg)
탈세포화를 하지 않은 경골견	269.9 $\pm$ 10.9
탈세포 단계를 수행한 경골견	62.7 $\pm$ 8.5

[102]

[103] 실험예 3: 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질을 이용한 줄기 세포의 주입

[104] <실험예 3-1>: 세포 담지 촉진 물질의 제조

[105] 자가 줄기 세포와 함께 경골견에 자가 줄기 세포를 주입하기 위하여, 세포 담지 촉진 물질을 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[106] 무균공정 시스템에서 돼지 피부로부터 펩신을 처리하여 추출한 콜라겐 겔은 (주)바이오랜드로부터 구매하였으며, 시험 성적서를 확인한 결과 콜라겐의 99 % 이상은 type I의 형태이다.

[107] 콜라겐 용액을 겔화시키기 위한 재구성용 완충용액은 0.05 N NaOH 수용액에 2.2 % NaHCO₃(90421-C, SAFC Bioscience, USA)와 200 mM HEPES (H4034, SIGMA, USA)를 용해한 것으로 총 부피를 100 ml에 맞추었다. 0.2 μ m syringe filter (16534, Satorius stedim, USA)를 이용하여 여과멸균하고, 사용하기 전까지 4°C 냉장 보관하였다. PBS 용액을 0.2 μ m syringe filter를 이용하여 여과멸균하고, 사용하기 전까지 4 °C에서 냉장 보관하였다.

[108] 최종 콜라겐 용액의 조성은 산가용성 콜라겐 겔 용액 : PBS (10x 농축용액) : 재구성용 완충용액을 8 : 1 : 1로 혼합하여 제조하였다. 혼합시 얼음이 들어있는 스티로폼 박스에 넣어 중성 콜라겐 겔의 급격한 겔화가 발생하지 않도록 하였다.

[109]

[110] <실험예 3-2>: 세포 담지 촉진 물질에서 자가 줄기 세포의 증식률 확인

[111] 원심분리 후 모은 인간골수유래 중간엽 줄기세포는 각각 1x10⁵, 2x10⁵ 및 5x10⁵ cell/cm² 군으로 나누고, 상기에서 제조한 중성 콜라겐겔과 천천히 파이펫팅하여 기포가 발생하지 않도록 혼합하였다. 이 세포 담지 콜라겐 겔을 48 웰 배양 플레이트 디쉬(culture plate dish)에 150 μ l 씩 분주하고 37 °C, 5 % CO₂의 배양기

(NB-203XLSP, N-Biot ek, KOREA)에서 1시간 동안 정치하였다. 1시간 뒤 젤화가 된 것을 확인(반투명)하고, 10% FBS (16000, GIBCO, USA), 1% penicillin-streptomycin (15140, GIBCO, USA)이 포함된 a-MEM (12571, GIBCO, USA) 200 μ l 씩을 첨가하였다. 그 후 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양을 진행하였다.

- [112] 콜라겐젤 농도 (0.5, 1.0%) 및 인간 골수 유래 중간엽 줄기세포 수 (1×10^5 , 2×10^5 및 5×10^5 cell/cm²)에 따른 줄기세포 담지 콜라겐 젤 배양 1, 3, 7일차 세포 생존율을 측정하였다. 자세한 측정 방법은 다음과 같다. EZ Cyttox assay kit (Cat.no EZ3000, DAIL LAB, KOREA)에 들어 있는 바이알 (5 ml)을 꺼낸 후 클린벤치내로 옮겼다. 15 ml 코니컬 튜브(cornical tube)에 10 % FBS, 1 % 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 포함된 a-MEM 3 ml를 파이펫을 이용하고 첨가하고 EZ Cyttox 시약 300 μ l를 넣고 혼합하였다. 줄기세포 담지 콜라겐 젤 배양에 사용된 배지를 진공흡입 방법으로 제거하고, EZ Cyttox 시약이 혼합된 배지를 48 웰 배양 플레이트 디쉬 각각의 웰에 200 μ l 씩 첨가하였다. 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 배양을 진행하였다. ELISA reader기 (1420, PerkinElmer, USA)를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(도 12 참조).

[113]

- [114] <실험예 3-3>: 자가 줄기 세포가 담지된 중성 콜라겐의 제조의 줄기 세포에 주입

- [115] 자가 줄기 세포를 주입하기 위하여 상기에서 탈세포화한 경골건에 극세사침(M100SWBL 모델, 대한민국)을 적용함으로써 형성하였다. 상기 포어의 직경은 약 10 마이크로미터(μ m)이었다. 상기 <실험예 3-2>에서 제조한 줄기세포 담지 콜라겐 젤을 포어가 형성된 경골건에 주입하였다.

[116]

- [117] 실험예 4: 물리적 자극을 이용한 연조직 지지체 배양

- [118] <실험예 4-1>: 물리적 자극을 동반한 연조직 지지체 배양

- [119] 생체배양기 내에서 물리적 자극 조건 및 시간 설정에 따라 경골건에 접종된 줄기세포 담지 젤 이식체의 물리적 강도 성향을 비교 분석하였다. 즉, 이식체의 강도 향상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 시편의 크기를 12 x 1 cm² (가로x세로)로 준비한 후 챔버 내에 장착하였다. 실험군의 경우 컴퓨터 프로그램 상에서 10 % (양 말단 각각 2 mm)의 인장(tension) 자극과 90°(상하 시계 및 반 시계 방향으로 각각 45°의 비틀림(torsion) 자극 및 1 Hz의 빈도수 (frequency) 조건으로 1, 3, 7일 동안 생체배양기 내에서 물리적 자극을 주어 실험을 진행하였다(표 3). 대조군의 경우 생체배양기 챔버 내에서 물리적인 자극을 주지 않고 7일간 배양하였다.

- [120] 표 3

[Table 3]

군		물리적 자극 조건						회수기 간	N수
		Tension (10 %)		Torsion (90°)		Frequency			
		상부	하부	상부	하부	상부	하부		
대조 군	-	-	-	-	-	-	-	7일	3
실험 군	1	2 mm	2 mm	45°	45°	1 hz	1 hz	1일	3
	2	2 mm	2 mm	45°	45°	1 hz	1 hz	4일	3
	3	2 mm	2 mm	45°	45°	1 hz	1 hz	7일	3

[121]

[122]

[123]

<실험예 4-2>: 물리적 자극을 준 줄기세포 담지 겔 이식군의 실시간 PCR 분석
물리적 자극을 준 이식군에서 세포의 분화에 따른 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 mRNA를 분석하였다. RNA는 RNeasy mini kit (74136, Qiagen, USA)을 사용하여 추출하였다. 수거한 조직 30 mg에 RLT Plus buffer 600 μ l를 넣고 균질화 시켰다. 3분간 최대 RPM으로 원심분리하고 파이프팅하여 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 2 ml 수집 튜브에 gDNA 제거 스피ن 컬럼(Eliminator spin column)을 올리고 균질화하여 용해된 조직을 넣어주었다. 10,000 x g에서 30초간 원심분리하여 여과된 액을 남기고 컬럼은 제거 하였다. 70 % 에탄올 600 μ l를 수집 튜브에 넣고 파이프팅하여 혼합하였다. 새로운 2 ml 수집 튜브에 RNeasy 스피ن 컬럼을 올리고 1,000 μ l 혼합액을 넣어주었다. 뚜껑을 닫고 10,000 xg에서 15초간 원심분리하고 여과된 액은 제거하였다. RNeasy 스피ن 컬럼에 RW1 buffer 700 μ l를 넣고, 10,000 xg에서 15초간 원심분리하고 여과된 액은 제거하였다. RNeasy 스피ن 컬럼에 RPE buffer 500 μ l를 넣고, 10,000 xg에서 15초간 원심분리하고 여과된 액은 제거하였다. RNeasy 스피ن 컬럼에 RPE buffer 500 μ l를 넣고, 10,000 xg에서 2분간 원심분리하고 여과된 액은 제거하였다. 새로운 1.5 ml 수집 튜브에 RNeasy 스피ن 컬럼을 올리고, 스피ن 컬럼 멤브레인에 RNase-free water 50 μ l를 넣고, RNA 추출물을 얻기 위하여 10,000 x g에서 1분간 원심분리 하였다.

[124]

cDNA 합성을 하기 위하여 SuperScript®VILO cDNA Synthesis Kit (11754-050, Invitrogen, USA)을 사용하였고, 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 5x VILO Reaction Mix 4 μ l, 10x SuperScript Enzyme Mix 2 μ l, RNA 2.5 μ g을 혼합한 후 최종 부피를 20 μ l로 맞추기 위하여 DEPC-treated water를 첨가하였다. 혼합한 시약을 25 °C에서 10분간 인큐베이팅, 42 °C에서 60분간 인큐베이팅, 85 °C에서 5분간 반응시키고 종료시켰다. 사용하기 전까지 -20 °C 냉동고에 보관하였다.

[125]

그 후, Real time PCR 분석을 위하여 SYBR®Premix Ex Taq(RR420Q, TaKaRa,

JAPAN)을 사용하였고, 다음과 같은 방법으로 진행하였다. SYBR®Premix Ex Taq (1x) 12.5 μl , 0.2 uM PCR Forward Primer 0.5 μl , 0.2 uM PCR Reverse Primer 0.5 μl , cDNA 합성 시료 2.0 μl 와 DW water 9.5 μl 를 혼합하여 총 부피를 25 μl 로 맞추었다. Real time PCR 기기 (TP800, TaKaRa, JAPAN)를 사용하여 1 step은 1 cycle, 95 °C에서 30초간 진행하였고, 2 step은 95 °C에서 5초, 60 °C에서 30초간 40 cycle로 진행하였다. primer는 collagen type I, type III 및 tenascin-c를 사용하였다(표 4).

[126] 표 4

[Table 4]

Genes	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
Collagen I	5'-CAGGGTGTTCTTGGAG ACCT-3'(서열번호 1)	3'-AGGAGAGCCATCAGCACC TT-5'(서열번호 2)
Collagen III	5'-GAAAATGGAAACCTG GGGA-3'(서열번호 3)	3'-CACCCCTTTGGACCAGGACT T-5'(서열번호 4)
Tenascin-C	5'-TACAGCCTGGCAGACC TGAG-3'(서열번호 5)	3'-ATTGCTTGGGAGCAGTCCT T-5'(서열번호 6)
GAPDH	5'-AAGGGTCATCATCTCT GCCC-3'(서열번호 7)	3'-GTGATGGCATGGACTGTG GT-5'(서열번호 8)

[127] <실험예 4-2>: 물리적 자극을 준 줄기세포 담지젤 이식군의 GAG 분석

[128] 돼지 경골건 표면에 접종한 줄기세포 담지젤 이식군 (5×10^5 cell/cm²)을 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 군과 물리적 자극을 주지 않은 군의 배지에서 분비한 GAG의 함량 분석을 진행하였다. 1, 3, 7일간 배양한 배양액을 모은 후 GAG assay kit을 이용하여 GAG(Glycosaminoglycan) 함량 분석을 진행하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. 표준시약으로 Sulfated Glycosaminoglycan(0~5 μg)을 이용하여 마이크로센트리퓨즈 튜브(microcentrifuge tube)에 넣고, 정제수로 최종 부피를 100 μl 로 맞추었다. 1, 3, 7일간 배양한 줄기세포 담지젤 이식군의 배지를 마이크로센트리퓨즈 튜브에 넣고, 최종 부피를 100 μl 로 맞추었다. 준비한 모든 튜브에 1.0 ml의 glycosaminoglycan Dye Reagent를 첨가하고 나서 vortex mixer를 이용하여 30 분 동안 섞었다. 그 후 10,000 xg에서 10 분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층 액을 제거하고 tube 바닥이나 벽에 있는 용액을 좀 더 깨끗이 제거하기 위해서 튜브를 뒤집고, 흡수지(absorbent paper)를 사용하였다. Glycosaminoglycan-dye complex pellet에 1 ml의 Blyscan Dissociation Reagent를 첨가하고, 10분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 글라이코사민글라이칸(glycosaminoglycan)과 결합한 dye를 녹였다. UV spectrometer를 이용하여 656 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. GAG의 최종 농도는 chondroitin-4-sulfate의 표준 곡선을 이용하여 정량하였다(도 14 참조).

[129]

[130] <실험예 4-2>: 물리적 자극을 준 줄기세포 담지젤 이식군의 콜라겐 분석

[131]

돼지 경골건 표면에 접종한 줄기세포 담지젤 이식군 (5×10^5 cell/cm²)을 생체배양기내에서 물리적 자극을 준 군과 물리적 자극을 주지 않은 군의 배지에서 분비한 collagen의 함량 분석을 진행하였다. 1, 3, 7일간 배양한 배양액을 모은 후 collagen assay kit을 이용하여 collagen의 함량 분석을 진행하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. 표준시약으로 collagen solution (0~50 μ g)을 이용하여 마이크로센트리퓨즈 튜브에 넣고, 정제수로 최종 부피를 100 μ l로 맞추었다. 1, 3, 7일간 배양한 줄기세포 담지젤 이식군의 배지를 마이크로센트리퓨즈 튜브에 넣고, 최종 부피를 100 μ l로 맞추었다. 준비한 모든 튜브에 1 ml의 Sircol dye reagent를 첨가하고 나서 볼텍스 혼합기를 이용하여 30 분 동안 섞었다. 그 후 10,000 xg에서 10 분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상층 액을 제거하고 튜브 바닥이나 벽에 있는 용액을 좀 더 깨끗이 제거하기 위해서 튜브를 뒤집고, 흡수지 (absorbent paper)를 사용하였다. Collagen-dye complex pellet에 Alkali reagent를 첨가하고, 10분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 Collagen과 결합한 dye를 녹였다. UV spectrometer를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Collagen의 최종 농도는 collagen의 표준 곡선을 이용하여 정량하였다(도 15 참조).

서열목록 Free Text

[132]

서열번호 1: cagggtgttc ctggagacct

[133]

서열번호 2: aggagagcca tcagcacctt

[134]

서열번호 3: gaaaatggaa aacctgggga

[135]

서열번호 4: caccctttgg accaggactt

[136]

서열번호 5: tacagcctgg cagacctgag

[137]

서열번호 6: attgcttggg agcagtcctt

[138]

서열번호 7: aagggtcatc atctctgccc

[139]

서열번호 8: gtgatggcat ggactgtggt

청구범위

- [청구항 1] 인간 또는 동물의 몸체로부터 획득된 동종 연조직 지지체를 획득하는 단계;
 상기 획득된 동종 연조직 지지체를 세척 및 살균하는 단계;
 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리하여 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계;
 상기 면역 거부 반응 세포가 제거된 동종 연조직 지지체에 하나 이상의 포어를 형성하는 단계;
 상기 형성된 포어에 사용자의 자가 줄기 세포를 주입하는 단계; 및
 상기 자가 줄기 세포가 주입된 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계;
 를 포함하는, 자가 줄기 세포가 이식된 동종 연조직 이식체를 제조하는 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 동종 연조직 지지체는 인대, 또는 뼈 단편 연결 인대인 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 세척 및 살균 단계는 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 과산화수소를 처리하고, 초음파를 적용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 처리되는 과산화수소는 0.1 내지 5.0 퍼센트(%) 농도 범위 중 선택되는 농도를 갖고, 상기 적용되는 초음파는 120 내지 400 와트(W) 범위 중 선택되는 출력을 갖는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 세척 및 살균 단계는 상기 획득된 동종 연조직 지지체에 방사선 방어 물질을 처리하고, 방사선을 조사하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 처리되는 방사선 방어 물질은 코발트 60(^{60}Co)이고, 조사되는 방사선은 12 내지 50 킬로그레이(kGy) 범위 중 선택되는 감마선인 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 트립신, 콜라게나제 및 프로테아제를 포함하는 효소 용액을 처리하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리한 후 생리학적 염수로 수세 처리하여 세척하는 단계를 더 포함하는

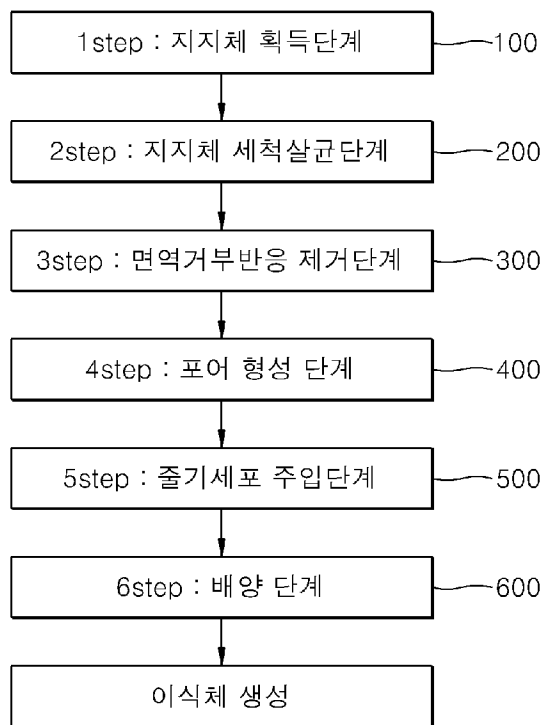
- 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 면역 거부 반응 세포를 제거하는 단계는 상기 세척 및 살균된 동종 연조직 지지체에 효소 용액을 처리한 후 생리학적 염수로 수세 처리한 후 증류수와 함께 삼투 처리하여 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 포어를 형성하는 단계에 있어서, 상기 포어는 1 내지 1000 마이크로미터(μm) 범위 중 선택되는 크기를 갖는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 자가 줄기 세포의 주입 단계는 상기 자가 줄기 세포의 주입 전에 또는 동시에 자가 줄기 세포 담지 촉진 물질을 주입하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 동종 연조직 지지체를 배양하는 단계는 상기 동종 연조직 지지체에 물리적 자극을 제공하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 물리적 자극은 초당 1회 이하의 빈도로 상기 동종 연조직 지지체에 제공되는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 상기 물리적 자극의 제공은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극을 제공하거나, 상기 동종 연조직 지지체의 세로 축을 기준으로 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림을 제공하거나, 또는 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극을 제공함과 동시에 상기 동종 연조직 지지체의 세로 축을 기준으로 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림을 제공하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단에 인장 자극을 제공하는 것은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단을 길이 방향으로 연장하되, 일 말단을 상기 동종 연조직 지지체의 전체 길이 대비 10% 이하 범위로 연장함과 동시에 다른 말단을 상기 동종 연조직 지지체의 전체 길이 대비 10% 이하 범위로 연장하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.
- [청구항 16] 제13항에 있어서, 상기 동종 연조직 지지체의 양 가로 방향으로 비틀림을 제공하는 것은 상기 동종 연조직 지지체의 양 말단을 회전시키되, 일 말단을 시계 방향으로 45도 이하 범위로 회전시킴과 동시에 다른 말단을 반시계 방향으로 45도 이하

범위로 회전시키는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.

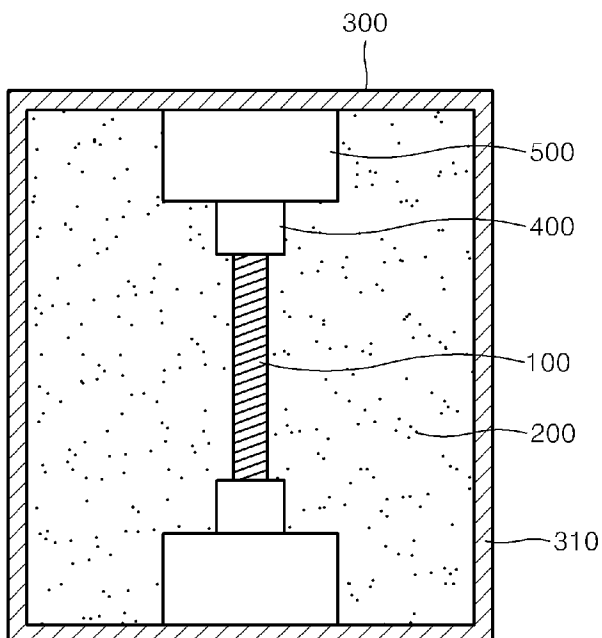
[청구항 17]

제1항에 있어서, 상기 배양 단계는 7일 이하 범위에서 진행하는 것을 특징으로 하는 동종 연조직 이식체 제조 방법.

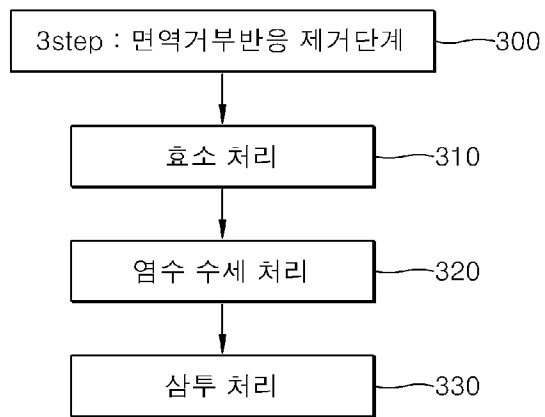
[Fig. 1]



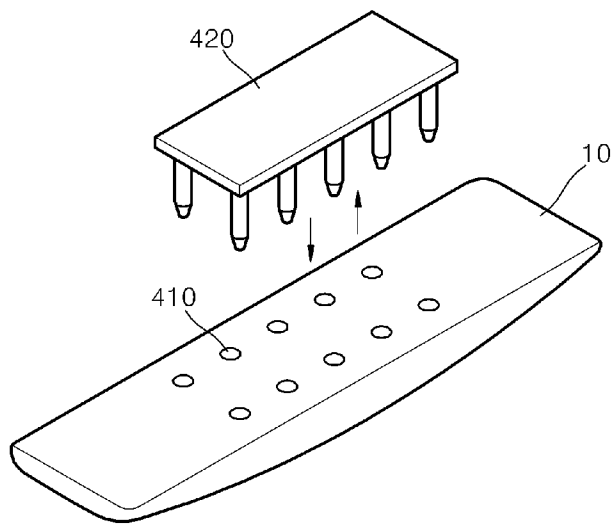
[Fig. 2]



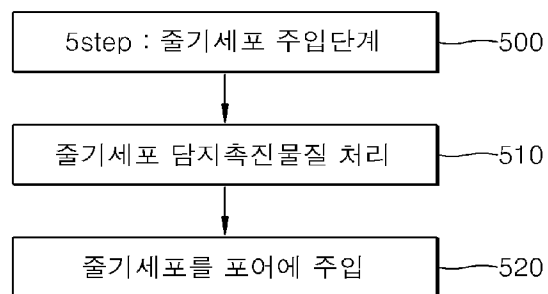
[Fig. 3]



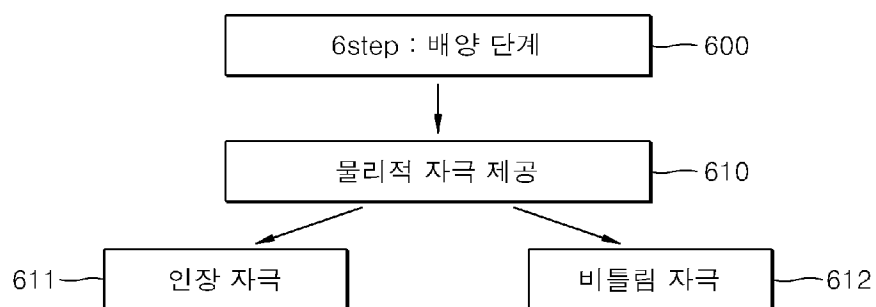
[Fig. 4]



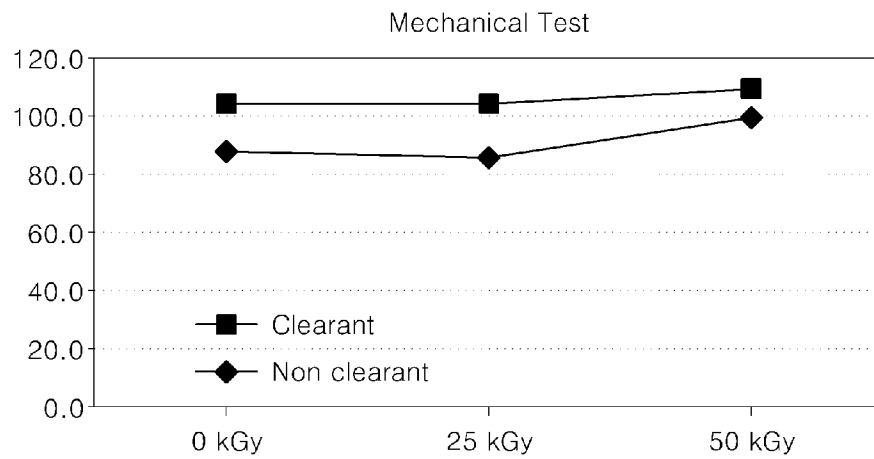
[Fig. 5]



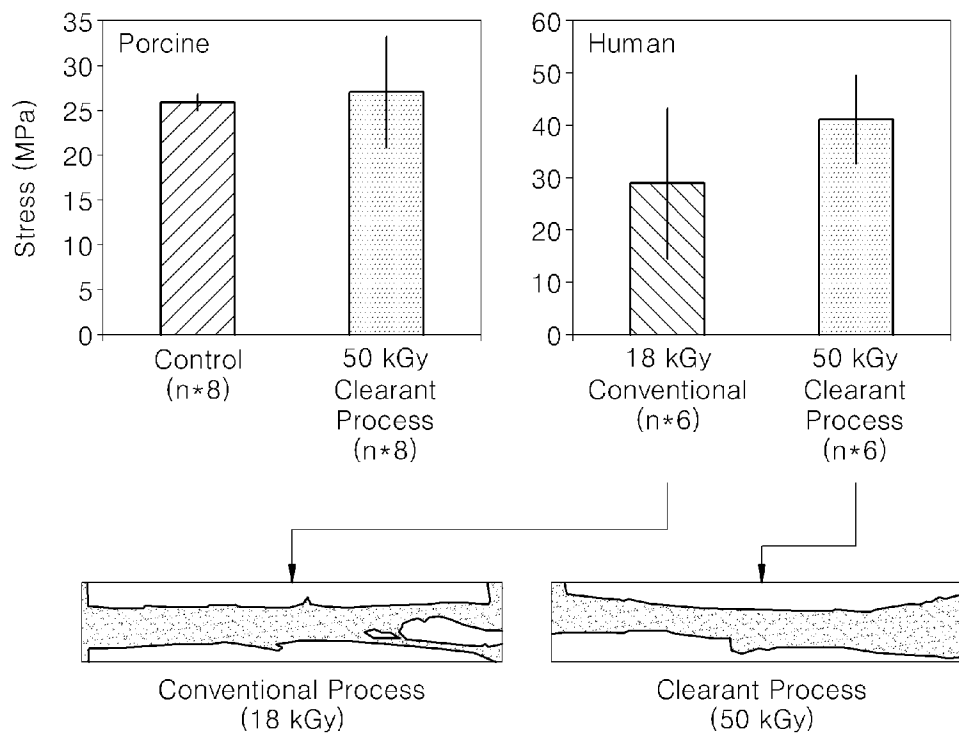
[Fig. 6]



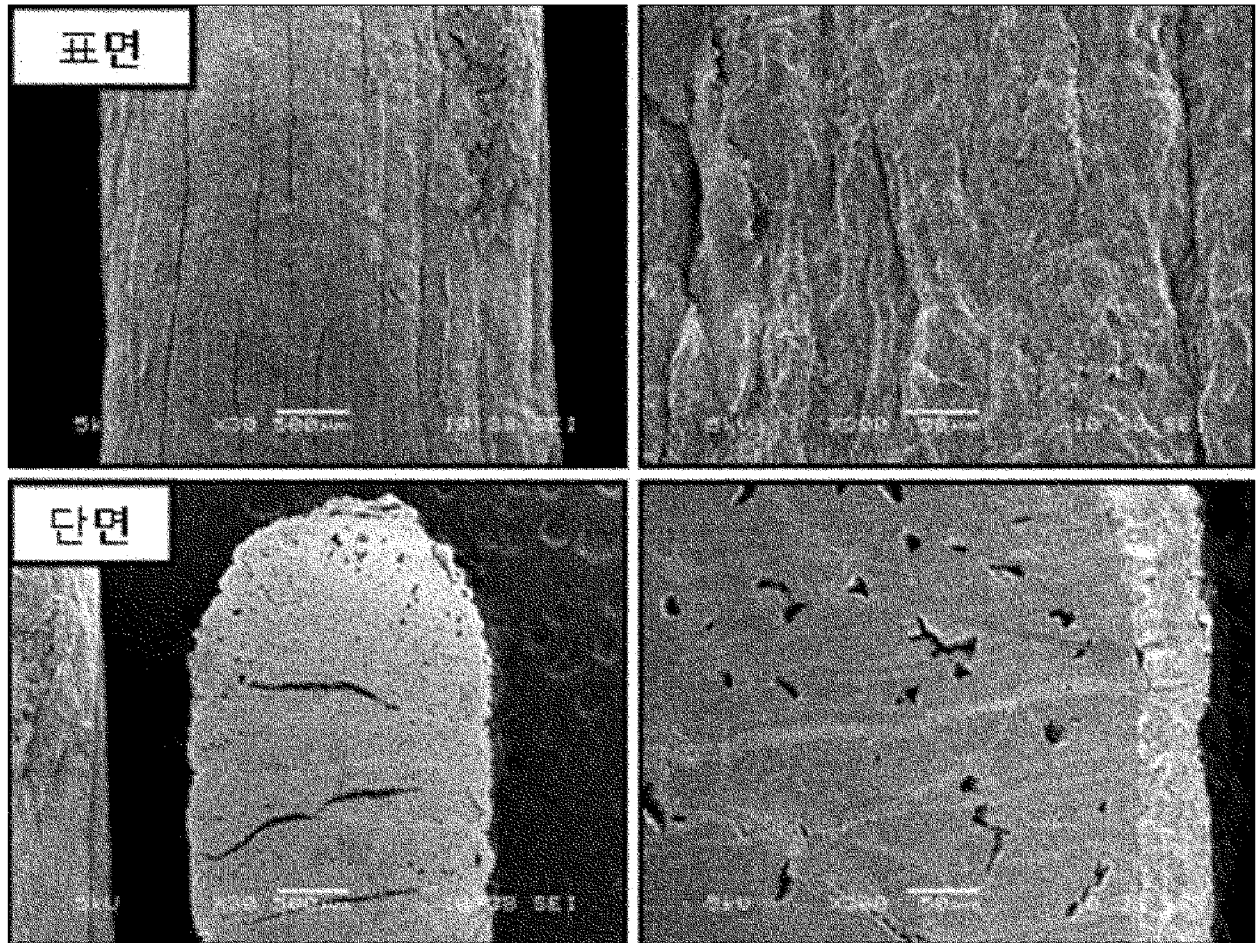
[Fig. 7]



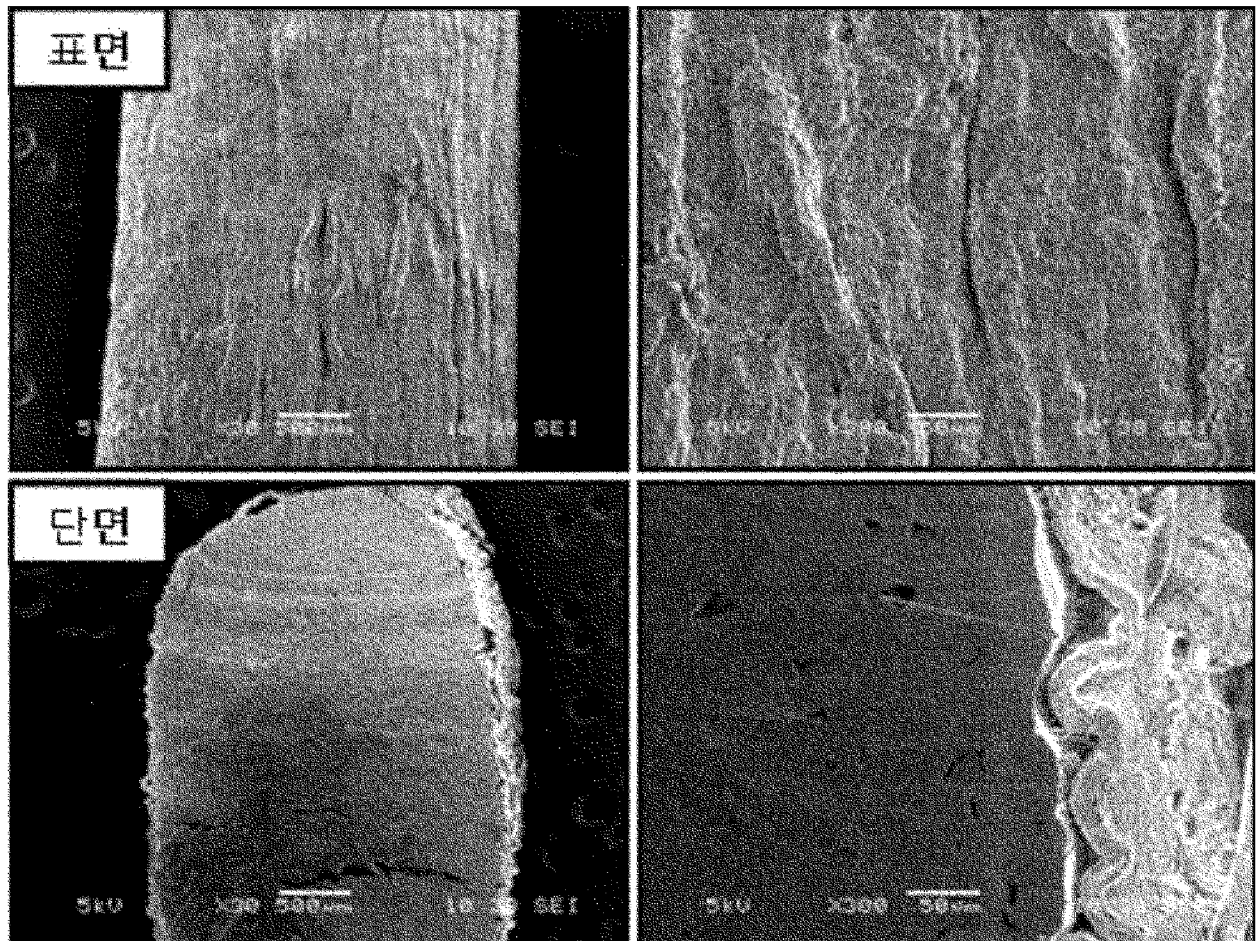
[Fig. 8]



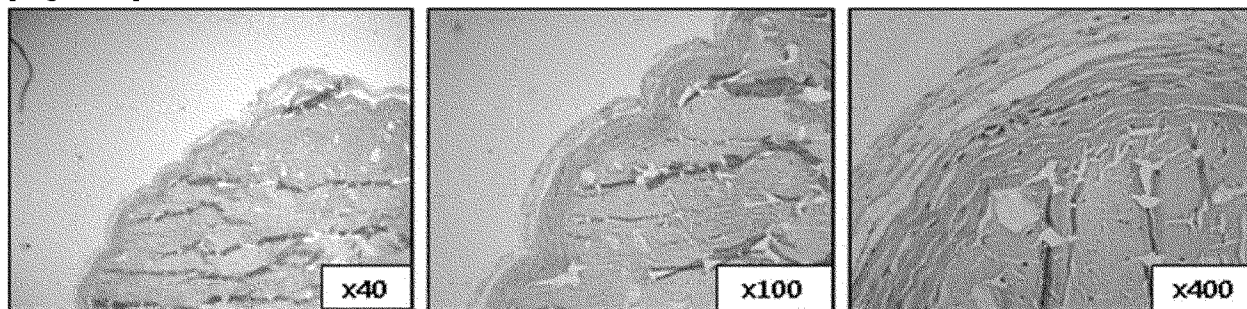
[Fig. 9a]



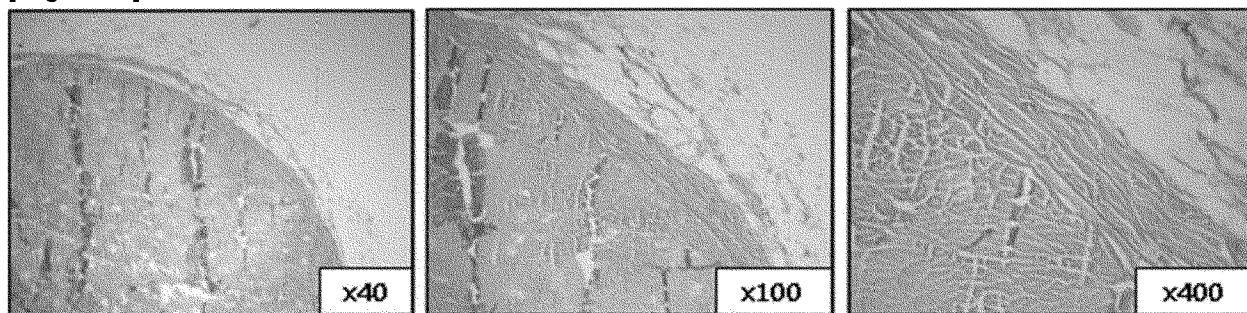
[Fig. 9b]



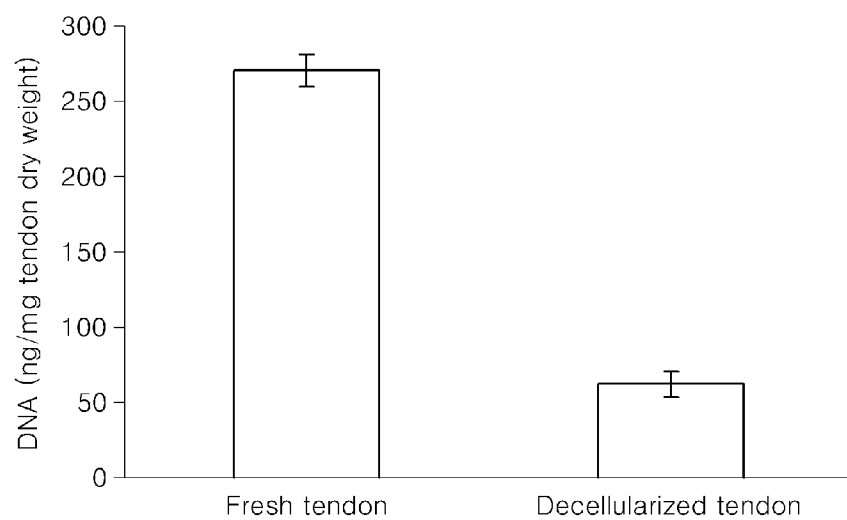
[Fig. 10a]



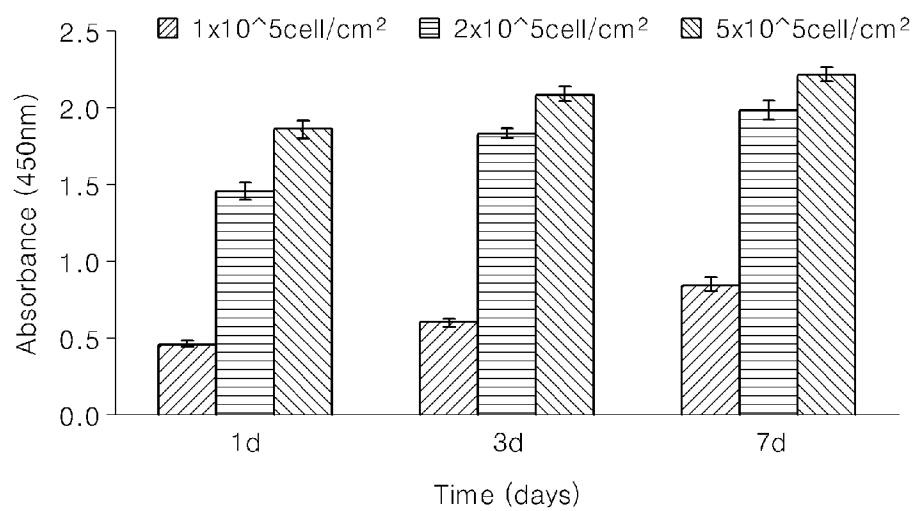
[Fig. 10b]



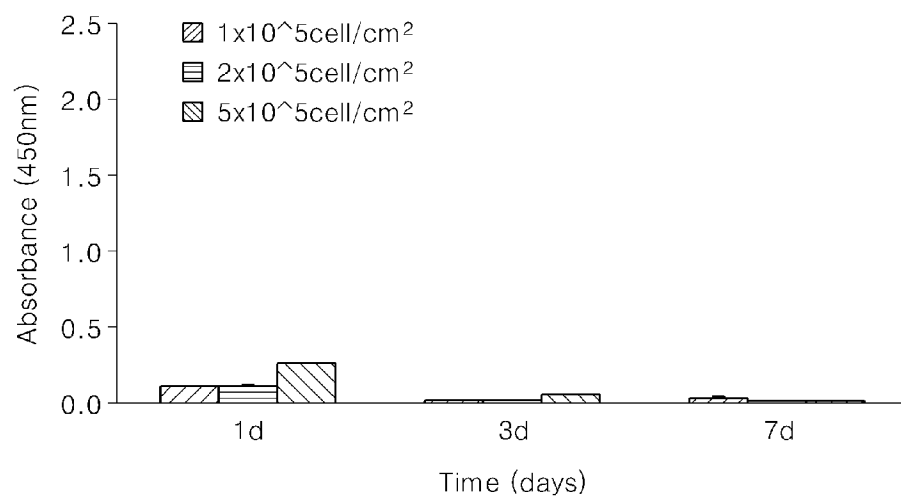
[Fig. 11]



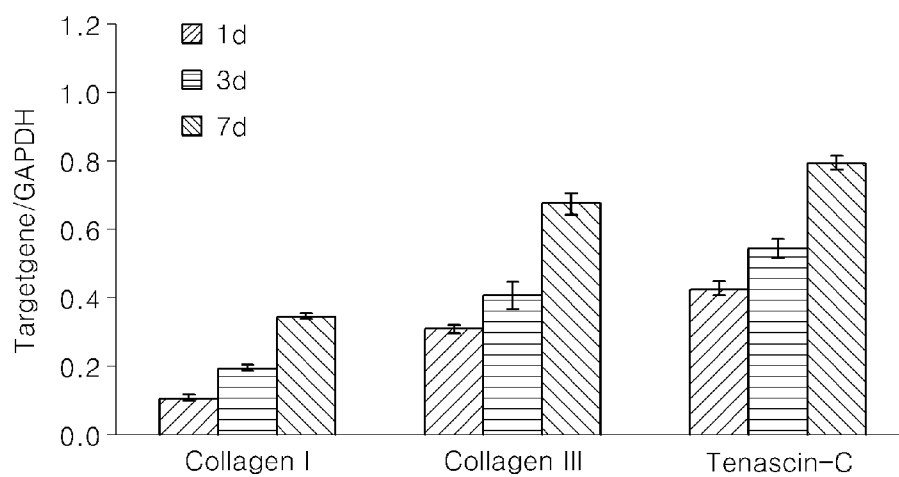
[Fig. 12a]



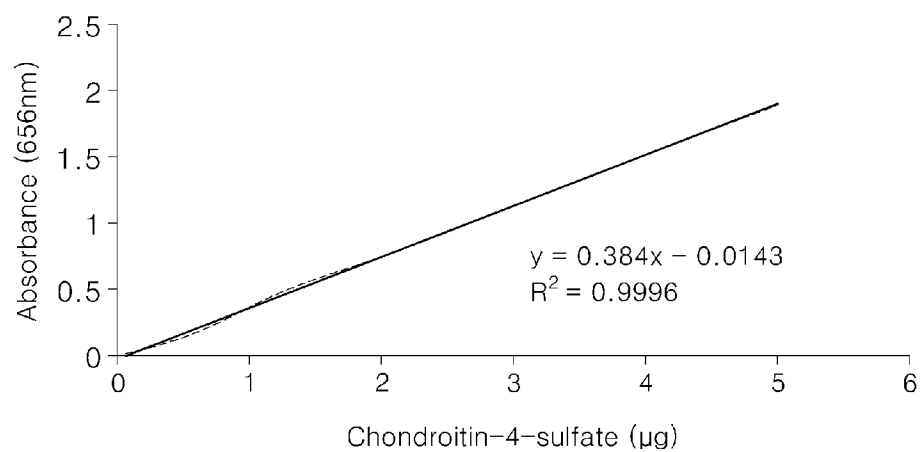
[Fig. 12b]



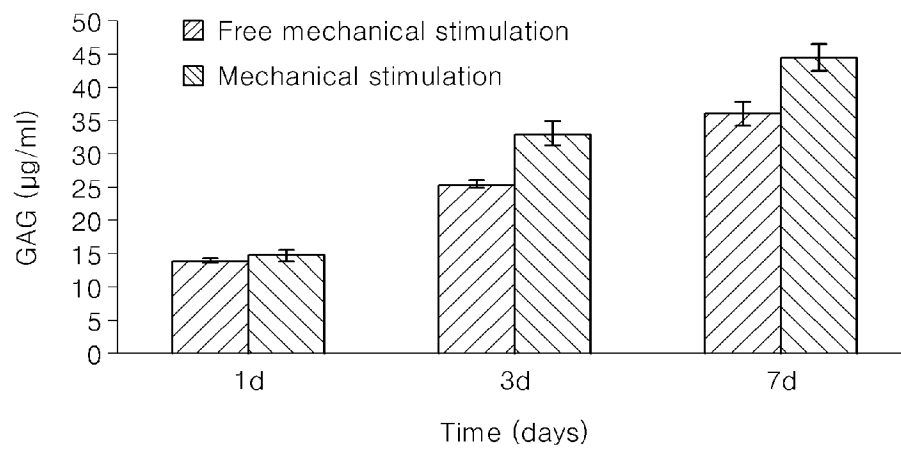
[Fig. 13]



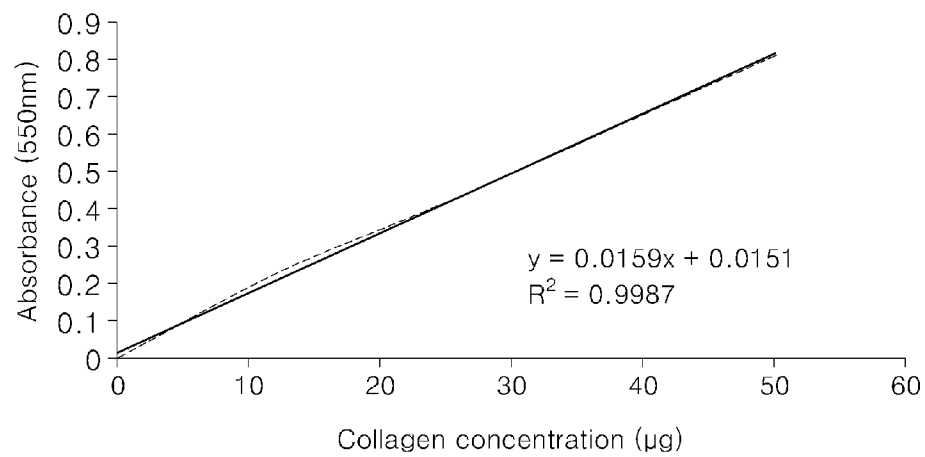
[Fig. 14a]



[Fig. 14b]



[Fig. 15a]



[Fig. 15b]

