(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0101342
(43) 공개일자 2019년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *A61L 27/36* (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0081 (2013.01)
A61L 27/3604 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0102386(분할)
(22) 출원일자 2019년08월21일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2018-0019893
원출원일자 2018년02월20일
심사청구일자 2018년02월20일
(30) 우선권주장
1020170025622 2017년02월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
선웅
서울특별시 노원구 덕릉로73길 28, 205동 1501호 (중계동, 양지대림2차아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

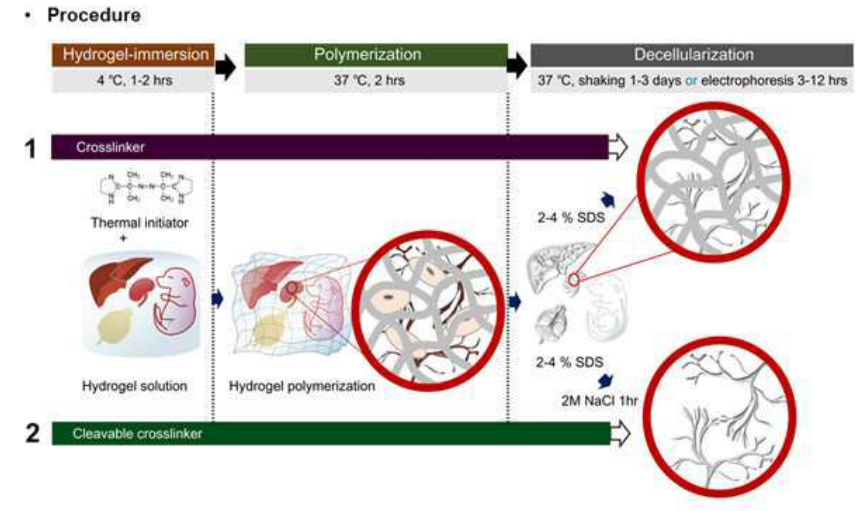
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **하이드로겔 중합체를 이용한 탈세포화 조직의 제조방법 및 이로부터 제조된 탈세포화 조직**

(57) 요 약

본 발명은 탈세포화 조직의 제조방법 및 이로부터 제조된 탈세포화 조직에 관한 것으로, 본 발명의 탈세포화 조직의 제조방법은 탈세포화 과정에서 세포외기질 단백질의 손실을 방지하고 조직의 구조 특성을 유지하며, 조직의 종류에 관계없이 효율적으로 조직 내 세포를 제거할 수 있고, 이로부터 제조된 탈세포화 조직은 세포 배양용 지지체, 조직 이식용 소재, 수복재 또는 인공 장기용 소재로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/3691 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)
C12N 2533/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016904253
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 뇌발달 지도 구축을 통한 뇌발달장애 진단기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

분리된 조직에 하이드로겔(hydrogel) 단량체 용액을 주입하는 단계;

상기 하이드로겔 단량체를 중합시켜 하이드로겔-조직을 형성하는 단계; 및

상기 하이드로겔-조직 내 세포를 제거하는 단계;를 포함하는, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 분리된 조직은, 포유동물의 장기로부터 분리된 조직, 또는 포유동물의 배아 및 포유동물의 사후 조직으로부터 선택되는 것인, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 단량체는 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide), 폴리아닐린, N-N-디메틸아크릴아마이드(DMA), N,N'-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA), N,N-메틸렌비스아크릴아마이드, 아크릴산, 메타크릴산, 비닐술폰산, 스티렌술폰산, 폴리아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 글리시딜아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트(MMA), 소듐 폴리아크릴레이트, 2-히드록시에틸메타크릴레이트(HEMA), 글리세롤 메타크릴레이트, N-비닐피롤리돈, N-아클로일피페리딘, N-아크로일피롤리딘, 시스타민비스아크릴아마이드(cystamine bisacrylamide), 프로필렌글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 디아세톤 아크릴아마이드(DAA, diacetone acrylamide) 또는 이들의 혼합물인, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔-조직 형성 단계는 열중합 개시제, 광중합 개시제 또는 촉매의 존재 하에 수행되는, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔-조직 형성 단계는 방사선 조사 또는 pH 변화에 의해 수행되는, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 열중합 개시제는 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드인, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조직 내 세포를 제거하는 단계는 세정액(detergent) 처리, 고정수압 관류, 효소 처리, 동결/해동 반복 사이클 처리 또는 초음파 인가에 의해 수행되는, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세정액은 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulfate),소듐 데옥시콜레이트(SD, sodium deoxycholate), 트리톤X-100 (Triton X-100) 또는 이들의 혼합물인, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 단량체 용액은, 절단 가능한 가교제(cleavable crosslinker)를 포함하는, 탈세포화 조직의 제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항에 따른 방법으로 제조된, 탈세포화 조직.

청구항 11

제9항에 따른 방법으로 제조된 탈세포화 조직을 준비하는 단계;

상기 가교제를 절단하는 단계; 및

상기 탈세포화 조직의 하이드로겔을 제거하는 단계;를 포함하는, 탈세포화 조직의 멸균방법.

청구항 12

조직 및 상기 조직을 지지하는 하이드로겔 중합체를 포함하고,

상기 조직 내 세포가 제거된 탈세포화 조직으로서,

상기 하이드로겔 중합체는 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide), 폴리아닐린, N-N-디메틸아크릴아마이드(DMA), N,N'-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA), N,N-메틸렌비스아크릴아마이드, 아크릴산, 메타크릴산, 비닐술폰산, 스티렌술폰산, 폴리아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 글리시딜아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트(MMA), 소듐 폴리아크릴레이트, 2-히드록시에틸메타크릴레이트(HEMA), 글리세롤 메타크릴레이트, N-비닐피롤리돈, N-아클로일피페리딘, N-아크로일피롤리딘, 시스타민비스아크릴아마이드(cystamine bisacrylamide), 프로필렌글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 디아세톤 아크릴아마이드(DAA, diacetone acrylamide) 또는 이들의 혼합물이 중합된, 탈세포화 조직.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 탈세포화 조직은, 세포 배양용 지지체, 조직 이식용 소재, 수복재 또는 인공 장기용 소재로 이용되는, 탈세포화 조직.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하이드로겔 중합체를 이용한 탈세포화 조직의 제조방법 및 이로부터 제조된 탈세포화 조직에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 탈세포화(decellularized) 생체조직은 이의 3차원 구조에 대한 세포 반응성 조사, 조직 이식, 조직 재생 등 세포외기질(ECM, extracellular matrix) 단백질을 필요로 하는 다양한 조직공학 분야에 적용할 수 있는 기술로 최근 각광받고 있다.

[0004] 조직 탈세포화는 생체로부터 획득한 조직에서 세포 성분을 선별적으로 제거한 후, 잔류의 세포외기질을 이용하기 위한 기술로, 탈세포화된 조직은 조직재건수술, 인공장기 이식용 소재, 피부 대체재 등으로 광범위하게 사용되고 있다.

[0005] 기존에 보고된 탈세포화 방법은 주로 물리적, 화학적, 효소적 처리를 병용한다. 일반적인 탈세포화 방법은 물리적 처리나 이온성 용액(ionic solution)을 이용하여 세포막을 파괴시키고, 효소적 처리를 통해 세포외기질로부터 세포의 구성성분(cellular component)을 분리시킨 다음, 세정액을 이용하여 세포 내 물질, 세포핵 물질, 세포 잔류물(debris)을 제거하는 과정으로 이루어진다.

[0006] 피부와 같이 세포외기질이 풍부한 조직은 탈세포화 이후에도 비교적 손상 없는 원형을 유지하므로, 탈세포화 후 3차원적 구조가 유지된 조직을 그대로 이용할 수 있다. 반면 세포 성분이 많은 조직의 경우, 탈세포화 후 확보한 세포외기질을 용해시켜 3D 프린팅을 위한 바이오잉크로 사용하는 등 후처리 공정이 필수적으로 수반된다. 특히, 인체 조직과 같이 현실적, 윤리적 문제 때문에 한정된 자원을 이용하는 경우 극히 제한된 조직만이 탈세포화 후 활용 가능한 한계가 있다.

[0007] 기존의 물리적, 화학적, 효소적 방법을 이용하여 탈세포화를 진행하면 생체조직 고유의 구조가 붕괴되거나 세포외기질 단백질의 손실이 발생한다. 또한, 이러한 처리 과정을 거치면서 생체조직이 물리적으로 약화되는 문제가 발생하기도 한다. 특히, 대형 동물의 장기 탈세포화는 장시간의 처리 과정이 요구되고, 이는 필연적으로 세포외기질 단백질의 손실과 구조 특성의 붕괴를 초래한다.

[0008] 탈세포화 시간을 단축시키기 위해 세정액을 강하게 사용하거나 물리적 힘을 증가시키는 등 추가의 조치가 이루어지고 있으나, 이 또한 세포외기질 단백질의 손실과 구조 특성의 붕괴를 수반한다.

[0009] 탈세포화 과정 중 조직의 물리적 특성이 약화되어 구조적 특성이 붕괴되거나 세포외기질 단백질의 손실이 발생하는 경우, 이식 후 체내의 결합조직 세포가 이식체 내부로 침투하여 새로운 세포외기질을 생산하고 충분한 재생이 진행되는데 한계를 나타낸다. 기존 보고에 따르면, 피부 조직의 복강 또는 복막 대체의 경우 4~6주 이내에 이식된 조직의 자연적 분해 과정이 진행되고, 이에 따라 재수술이 요구되거나 충분한 재생력이 구현되지 않는 문제가 발생한다.

[0010] 반면, 이러한 문제를 해결하기 위해 물리적, 화학적 처리의 강도를 약화시키면 세포 성분이 충분히 제거되지 않아 탈세포화 조직의 활용이 어려운 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 탈세포화 과정에서 세포외기질 단백질의 손실을 방지하고 조직의 구조 특성을 유지하며, 조직의 종류에 관계없이 효율적으로 조직 내 세포를 제거할 수 있는 탈세포화 조직의 제조방법 및 이로부터 제조된 탈세포화 조직을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 분리된 조직에 하이드로겔(hydrogel) 단량체 용액을 주입하는 단계; 상기 하이드로겔 단량체를 중합시켜 하이드로겔-조직을 형성하는 단계; 및 상기 하이드로겔-조직 내 세포를 제거하는 단계;를 포함하는, 탈세포화 조직의 제조방법이 제공된다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 분리된 조직은, 포유동물의 장기로부터 분리된 조직, 또는 포유동물의 배아 및 포유동물의 사후 조직으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 하이드로겔 단량체는 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide), 폴리아닐린, N-N-디메틸아크릴아마이드(DMA), N,N'-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA), N,N-메틸렌비스아크릴아마이드, 아크릴산, 메타크릴산, 비닐술폰산, 스티렌술폰산, 폴리아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 글리시딜아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트(MMA), 소듐 폴리아크릴레이트, 2-히드록시에틸메타크릴레이트(HEMA), 글리세롤 메타크릴레이트, N-비닐피롤리돈, N-아클로일피페리딘, N-아크로일피롤리딘, 시스타민비스아크릴아마이드(cystamine bisacrylamide), 프로필렌글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 디아세톤 아크릴아마이드(DAA, diacetone acrylamide) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 하이드로겔-조직 형성 단계는 열중합 개시제, 광중합 개시제 또는 촉매의 존재 하에 수행될 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 하이드로겔-조직 형성 단계는 방사선 조사 또는 pH 변화에 의해 수행될 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 열중합 개시제는 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드일 수 있다.

[0022] 일 측에 따르면, 상기 조직 내 세포를 제거하는 단계는 세정액(detergent) 처리, 고정수압 관류, 효소 처리, 동결/해동 반복 사이클 처리 또는 초음파 인가에 의해 수행될 수 있다.

[0023] 일 측에 따르면, 상기 세정액은 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulfate),소듐 데옥시콜레이트(SD, sodium deoxycholate), 트리톤X-100 (Triton X-100) 또는 이들의 혼합물 일 수 있다.

[0024] 일 측에 따르면, 상기 하이드로겔 단량체 용액은, 절단 가능한 가교제(cleavable crosslinker)를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법으로 제조된, 탈세포화 조직이 제공된다.

[0026] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 방법으로 제조된 탈세포화 조직을 준비하는 단계; 상기 가교제를 절단하는 단계; 및 상기 탈세포화 조직의 하이드로겔을 제거하는 단계;를 포함하는, 탈세포화 조직의 멸균방법이 제공된다.

[0027] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 조직 및 상기 조직을 지지하는 하이드로겔 중합체를 포함하고, 상기 조직 내 세포가 제거된 탈세포화 조직으로서, 상기 하이드로겔 중합체는 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide), 폴리아닐린, N-N-디메틸아크릴아마이드(DMA), N,N'-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA), N,N-메틸렌비스아크릴아마이드, 아크릴산, 메타크릴산, 비닐술폰산, 스티렌술폰산, 폴리아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 글리시딜아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트(MMA), 소듐 폴리아크릴레이트, 2-히드록시에틸메타크릴레이트(HEMA), 글리세롤 메타크릴레이트, N-비닐피롤리돈, N-아클로일피페리딘, N-아크로일피롤리딘, 시스타민비스아크릴아마이드(cystamine bisacrylamide), 프로필렌글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 디아세톤 아크릴아마이드

(DAA, diacetone acrylamide) 또는 이들의 혼합물이 중합된, 탈세포화 조직이 제공된다.

[0028] 일 측에 따르면, 상기 탈세포화 조직은, 세포 배양용 지지체, 조직 이식용 소재, 수복재 또는 인공 장기용 소재로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 탈세포화 조직의 제조방법은 하이드로겔 중합체를 전처리하여 조직을 지지함으로써, 이후 탈세포화 과정에서 세포외기질 단백질의 손실이나 조직의 구조 특성 붕괴를 방지할 수 있다. 하이드로겔이 조직을 지지하기 때문에 탈세포화를 위한 물리적, 화학적 처리 등의 강도를 조절할 수 있고, 이에 따라 조직의 종류에 관계없이 조직 관류(perfusion) 처치가 가능하지 않은 상태의 손상된 조직이나, 대형 조직에 대해서도 효율적으로 탈세포화 과정을 수행할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 탈세포화 조직에 생성된 빈 공간을 이용해 세포 배양용 지지체로 이용 가능하고, 세포 재증식(repopulation)을 통해 조직 이식용 소재, 수복재 또는 인공 장기용 소재로 활용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 탈세포화 조직의 제조방법을 도식화한 것이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 생쥐 간(liver)의 탈세포화 전, 후를 비교한 이미지이다.

도 2b는 생쥐 간 조직의 탈세포화 이후 세포 성분의 제거 여부를 확인하는 데이터이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예 및 종래 방법에 따라 제조된 탈세포화 전, 후 조직의 크기 및 형태를 비교한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예 및 종래 방법에 따라 제조된 탈세포화 조직의 세포외기질 단백질(collagen) 및 조직의 미세구조 유지 여부를 관찰한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 생쥐 신장(kidney) 조직에서의 콜라겐과 글리코사미노글리칸(GAG) 유지 여부를 관찰한 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 종류를 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 세포 배양용 지지체로서의 효능을 관찰한 것이다.

도 7b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직에 세포를 배양한 결과를 관찰한 것이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 이식 실험을 도식화한 것이다.

도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 생쥐 신장 조직의 이식 1주, 7주 후 혈관 생성 여부를 확인한 것이다.

도 8c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 생쥐 간 조직의 이식 3주 후 혈관 생성 여부를 확인한 것이다.

도 8d는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 인간 간 조직의 이식 3주 후 혈관 생성 여부를 확인한 것이다.

도 8e는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직 내 새로 생성된 혈관과 섬유아세포를 확인한 것이다.

도 8f는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 이식 1주, 3주 및 7주 후의 조직 내 세포 깊이를 나타내는 이미지이다.

도 8g는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 인간 간, 생쥐 신장 조직의 분열하는 세포를 확인한 것이

다.

도 9a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 이식 3주 및 7주 후의 세포외기질단백질과 조직섬유화 및 면역거부반응의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 9b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 이식 후 3주 및 7주의 세포외기질단백질과 조직섬유화 관련 단백질의 mRNA 발현 레벨의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 9c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 이식 3주 및 7주 후의 면역거부반응을 관찰한 결과를 나타내는 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 영상학적 특성을 확인한 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 탈세포화 조직의 관리 특성을 확인한 것이다.

도 12a는 절단 가능한 가교제(cleavable crosslinker)를 이용한 조직 내 하이드로겔 제거 방법을 도식화한 것이다.

도 12b는 절단 가능한 가교제를 이용하여 탈세포화된 생쥐의 장기 조직 및 돼지(porcine)의 장기 조직 내 하이드로겔을 제거한 결과를 나타내는 것이다.

도 13은 다양한 하이드로겔 단량체 및 이들의 조합의 사용에 따라 제조된 탈세포화 조직을 나타내는 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0036] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0037] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0038] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0039] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 분리된 조직에 하이드로겔(hydrogel) 단량체 용액을 주입하는 단계; 상기 하이드로겔 단량체를 중합시켜 하이드로겔-조직을 형성하는 단계; 및 상기 하이드로겔-조직 내 세포를 제거하는 단계;를 포함하는, 탈세포화 조직의 제조방법이 제공된다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 “하이드로겔-조직”은 하이드로겔 중합체에 의해 조직이 지지될 수 있도록, 하이드로겔 중합체와 조직이 결합한 상태의 복합체를 의미한다.

[0043] 본 명세서에서 사용된 용어 "하이드로겔(hydrogel)"은 물을 분산매로 하는 겔(gel) 형태의 물질을 의미하며, 상기 하이드로겔 내부는 친수성 화합물 간 형성된 네트워크 구조로 이루어져 있다.

[0044] 상기 분리된 조직은, 포유동물의 장기로부터 분리된 조직, 또는 포유동물의 배아 및 포유동물의 사후 조직으로

부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 포유동물은 소, 말, 낙타, 라마, 당나귀, 야크, 양, 돼지, 염소, 사슴, 알파카, 개, 너구리, 족제비, 여우, 고양이, 토끼, 햄스터, 모르모트, 생쥐, 다람쥐, 미국너구리 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 생쥐 또는 돼지일 수 있다.

[0045] 상기 분리된 조직은 세포 외 매트릭스 구조를 가짐으로써 탈세포화 처리가 가능한 조직일 수 있다. 예를 들어, 상기 조직은 간장, 신장, 뇨관, 방광, 요도, 혀, 편도, 식도, 위, 소장, 대장, 항문, 췌장, 심장, 혈관, 비장, 폐, 뇌, 뼈, 척수, 연골, 정소, 자궁, 난관, 난소, 태반, 각막, 골격근, 근육, 신경 및 피부로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 뇌, 심장, 간, 폐, 신장 또는 비장일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 조직을 분리하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

[0046] 종래 SDS(sodium dodecyl sulfate)와 같은 강력한 세정제를 처리하거나 고강도의 물리적 처리를 이용하여 조직의 탈세포화를 수행하는 경우, 세포외기질(ECM) 단백질의 손실이 발생하거나 조직의 구조가 붕괴되는 문제가 있었다. 특히, 이러한 한계로 인해 배아, 뇌와 같이 골격의 강도가 약한 조직에서는 효율적으로 탈세포화를 수행할 수 없었다.

[0047] 이에 본 발명자들은 탈세포화 효율을 향상시키고 다양한 조직에 적용할 수 있는 탈세포화 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 하이드로겔을 전처리하여 조직의 지지체로 사용함으로써 위와 같은 목적을 달성할 수 있음을 확인하였다.

[0048] 하이드로겔 전처리를 위해 상기 조직에 하이드로겔 단량체를 주입할 수 있다. 상기 하이드로겔 단량체의 주입은 조직을 하이드로겔 단량체 용액에 침지시킴으로써 수행할 수 있다.

[0049] 상기 하이드로겔 단량체는 친수성 화합물인 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide), 폴리아닐린, N-N-디메틸아크릴아마이드(DMA), N,N'-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA), N,N-메틸렌비스아크릴아마이드, 아크릴산, 메타크릴산, 비닐술폰산, 스티렌술폰산, 폴리아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 글리시딜아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트(MMA), 소듐 폴리아크릴레이트, 2-히드록시에틸메타크릴레이트(HEMA), 글리세롤 메타크릴레이트, N-비닐피롤리돈, N-아클로일피페리딘, N-아크로일피롤리딘, 시스타민비스아크릴아마이드(cystamine bisacrylamide), 프로필렌글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 디아세톤 아크릴아마이드(DAA, diacetone acrylamide) 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 이와 같이 하이드로겔 단량체의 다양한 조합을 사용하는 경우, 탈세포화된 조직에 하이드로겔 중합체의 특성이 반영될 수 있다. 예를 들어, 도 13에 나타낸 바와 같이, 폴리아크릴레이트를 사용하는 경우 조직의 부피가 8배 이상 커지거나 작아지게 할 수 있으며, 폴리아크릴산을 사용하는 경우 탄성이 높은 조직을 얻을 수 있다.

[0050] 조직으로 하이드로겔 단량체의 주입이 완료되면, 상기 하이드로겔 단량체를 중합시켜 하이드로겔-조직을 형성할 수 있다. 하이드로겔-조직의 형성은 열중합 개시제, 광중합 개시제 또는 촉매의 존재 하에 수행되거나, 방사선 조사 또는 pH 변화에 의해 수행될 수 있다. 열중합 개시제(thermal initiator) 존재 하에 하이드로겔을 중합하는 경우 온도 변화만으로 비교적 간단하게 단량체의 중합 개시 시점을 조절할 수 있으며, 구체적으로, 상기 열중합 개시제는 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 하이드로겔-조직이 형성되어 상기 조직의 지지가 완료되면, 조직 내 세포를 제거하는 탈세포화 과정을 수행할 수 있다. 이 때, 상기 탈세포화는 세정액(detergent) 처리, 고정수압 관류 또는 초음파 인가에 의해 수행될 수 있다. 이 때, 상기 세정액은 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulfate),소듐 데옥시콜레이트(SD, sodium deoxycholate), 트리톤X-100 (Triton X-100) 또는 이들의 혼합물과 같은 강력한 세정제일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 고정수압은 3,000atm 내지 10,000atm일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 조직에 결합된 하이드로겔 중합체가 탈세포화에 따른 세포외기질 단백질의 손실이나 세포 구조의 붕괴를 방지하므로, 조직의 종류나 탈세포화 강도에 관계없이 조직의 원형을 유지하면서 효율적으로 탈세포화 조직을 제조할 수 있다. 특히, 관류(perfusion) 처리가 불가능한 손상 조직이나 대형 조직도 신속하게 탈세포화할 수 있다. 이와 같은 방법으로 제조된 탈세포화 조직은 고유의 탄성 등 물리적 특성 또한 유지될 수 있다.

[0053] 나아가, 상기 탈세포화 조직은 종래 3차원 영상화 기술이 적용된 조직과 달리 굴절률 보정 없이도 투명성을 유지할 수 있다. 특히, 뼈 또는 혈관과 같은 구조 관찰이나 조직 내 세포외기질 단백질의 3차원 분포 정보의 획득이 용이할 수 있다.

[0054] 상기 탈세포화 조직은 세포 제거에 의해 내부에 빈 공간이 형성되어 세포 배양에 적합한 구조를 제공할 수 있고, 이를 통해 체외 질병모델, 기전연구 등에도 활용될 수 있다.

[0055] 한편, 분리된 조직에 주입되는 상기 하이드로겔 단량체 용액은, 절단 가능한 가교제(cleavable crosslinker)를 포함할 수 있다. 절단 가능한 가교제는 일반적으로 단량체와 공중합하여 가교 결합된 중합체 네트워크를 형성하나, 열, UV, pH 변화와 같이 외부 환경 변화에 의해 절단 될 수 있는 화합물을 의미한다. 절단 가능한 가교제로서는 N,N′-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA) 또는 시스타민 비스아크릴아마이드(BAC)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로는, N,N′-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA) 를 가교제로서 하이드로겔 단량체 용액에 혼합하여 조직의 탈세포화를 수행하는 경우, pH를 12로 높여 가교제를 절단시킴으로써 조직으로부터 하이드로겔을 제거할 수 있다(도 12a, b 참조).

[0056] 따라서, 본 발명의 다른 일 실시예는, 조직 및 상기 조직을 지지하는 하이드로겔 중합체를 포함하고, 상기 조직 내 세포가 제거된 탈세포화 조직으로서, 상기 하이드로겔 중합체는 아크릴아마이드(acrylamide), 메타크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide), 폴리아닐린, N-N-디메틸아크릴아마이드(DMA), N,N'-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA), N,N-메틸렌비스아크릴아마이드, 아크릴산, 메타크릴산, 비닐술폰산, 스티렌술폰산, 폴리아크릴산, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 글리시딜 아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트(MMA), 소듐 폴리아크릴레이트, 2-히드록시에틸메타크릴레이트(HEMA), 글리세롤 메타크릴레이트, N-비닐피롤리돈, N-아클로일피페리딘, N-아크로일피롤리딘, 시스타민비스아크릴아마이드(cystamine bisacrylamide), 프로필렌글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜(ethylene glycol) 디아세톤 아크릴아마이드(DAA, diacetone acrylamide) 또는 이들의 혼합물이 중합된, 탈세포화 조직을 제공한다.

[0057] 한편, 본 발명의 탈세포화 조직은 세포 재증식(reproduction)을 통해 이식용 인공장기 내지 조직뿐만 아니라, 이식 후 장기간 구조를 유지할 수 있고 혈관 생성 및 세포 침투가 용이하므로 광범위한 이식용 소재로 적용될 수 있다. 또한, 본 발명의 탈세포화 조직은 건조, 에탄올 멸균 등의 처치가 용이하므로, 이식체 제조를 위한 공정을 단순화할 수 있다.

[0058] 이에 따라, 상기 탈세포화 조직은, 세포 배양용 지지체, 조직 이식용 소재, 수복재 또는 인공 장기용 소재로 이용될 수 있다.

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 실시예 1: 탈세포화 조직 제조

[0063] 생쥐의 간을 적출하여 생리식염수로 세정한 후, 전체 용액 기준 아크릴아마이드(acrylamide) 10중량%, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide) 0.1중량% 및 열중합 개시제 0.05중량%를 포함하는 혼합 용액에 첨가하여 4℃에서 1일 동안 유지하였다. 이 때, 상기 열중합 개시제로는 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 사용하였다.

[0064] 이후, 혼합 용액을 37℃로 승온하여 중합 반응을 개시하고 2시간 동안 반응을 유지시킴으로써 아크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드와 간 조직의 중합 반응으로 형성된 복합체를 수득하였다.

[0065] 상기 복합체 주변의 하이드로겔을 제거하고, 4% SDS(sodium dodecyl sulfate)용액에 투입하여 1~3일 동안 37℃에서 반응시킴으로써 최종적으로 탈세포화 조직을 제조하였다.

[0066] 현미경을 이용하여 탈세포화 과정 전, 후의 간 조직을 관찰하였고, 조직 내 핵 정보를 확인할 수 있는 염색시약(Hoechst)을 이용하여 세포 성분의 제거여부를 확인하였다. 간 조직의 관찰 결과와 세포 성분의 제거 여부를 각각 도 2와 도 3에 나타내었다. 도 2의 이미지 및, 도 3의 DNA 정량분석, 웨스턴 블롯, 면역조직화학법을 이용한 결과를 통해 탈세포화 과정으로 간 조직 내 세포 성분이 제거되었음을 확인할 수 있다.

[0068] 실시예 2: 탈세포화 방법에 따른 세포외기질 단백질 및 세포 구조 특성 관찰

[0069] 상기 실시예 1에 따라 탈세포화 조직을 제조하는 경우 효과적으로 세포외기질(ECM) 단백질의 손실을 방지하고

세포 구조를 유지할 수 있는지 확인하기 위해, 기존의 탈세포화 방법과의 비교 실험을 수행하였다.

[0070] 구체적으로, 트립신(trypsin), 1% SDS 및 2% Triton X-100 용액을 처리하는 효소적 방법 및 4% SDS 용액을 처리하는 화학적 방법을 이용하되, 하이드로겔 단량체와의 중합 반응 없이 탈세포화된 생쥐 간 조직을 제조하였다.

[0071] 이러한 효소적 방법과 화학적 방법에 의해 제조된 탈세포화 조직과 상기 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 조직 각각에 대해 탈세포화 전, 후의 조직 크기 및 형태를 관찰하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0072] 도 3을 참고하면, 효소적 방법은 조직의 탈세포화가 효과적으로 이루어지지 않았고 화학적 방법은 강한 세정제로 인해 조직의 크기가 현저히 감소하였음을 확인할 수 있다. 반면, 상기 실시예 1에 따라 하이드로겔 단량체와의 중합 반응 후 탈세포화를 진행하는 경우 강한 세정제를 사용함에 따른 조직 크기의 축소가 발생하지 않으면서도 우수한 탈세포화 효율을 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[0073] 또한, 각각의 탈세포화 조직을 대상으로 세포외기질 단백질 및 조직의 미세구조 유지 여부를 확인하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4를 참고하면, 기존의 방법과 달리 상기 실시예 1의 방법에 따라 탈세포화 조직을 제조하는 경우, 세포외기질 단백질인 Ⅳ형 콜라겐(collagen type Ⅳ)과 조직의 미세구조를 원형에 가깝게 유지할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0074] 한편, 상기 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 조직에서 Ⅳ형 콜라겐 외 세포외기질 단백질도 손실 없이 유지되는지 생쥐 신장 조직에 대한 면역염색을 통해 확인하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5를 참고하면, Ⅰ형, Ⅲ형 콜라겐, 파이브로넥틴(fibronectin), HSPG, 라미닌, 니도겐(Nidogen) 등 다양한 세포외기질 단백질도 손실 없이 유지되는 것을 확인할 수 있다. 한편, 대표적인 세포외기질단백질인 콜라겐 및 글리코사미노글리칸(glycosaminogltcan, GAG)의 탈세포화 전, 후 단백질 양을 비교하는 경우에도 차이가 매우 적은 것을 확인할 수 있다.

[0076] 실시예 3: 조직의 종류에 따른 탈세포화 정도 관찰

[0077] 상기 실시예 1의 탈세포화 방법이 간 조직에만 국한되는 것인지 확인하기 위해, 생쥐의 배아, 뇌, 심장 등을 대상으로 상기 실시예 1과 동일한 탈세포화 방법을 수행하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0078] 도 6을 참고하면, 상기 실시예 1의 방법은 간 조직 외에도 배아, 뇌 심장, 폐, 신장, 비장 등의 탈세포화를 효율적으로 진행할 수 있음을 알 수 있다. 특히, 기존의 방법으로는 효율적인 탈세포화를 달성할 수 없었던 약한 조직인 배아, 뇌에서도 효과적으로 탈세포화가 진행되었음을 확인할 수 있다.

[0080] 실시예 4: 세포 배양용 지지체로서의 효능 관찰

[0081] 상기 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 조직이 세포 배양용 지지체로 적용될 수 있는지 확인하기 위해, 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 신장 조직에 헬라세포(HeLa cell)을 배양하고, 관찰 결과를 도 7a에 나타내었다. 또한, 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 뇌, 간, 폐 및 신장 조직에 헬라 세포, HT-22, 일차세포(primary cell) 등의 다양한 세포를 배양하여 관찰 결과를 도 7b에 나타내었다.

[0082] 도 7a를 참고하면, 세포의 성장 속도, 세포 사멸 등의 지표는 일반 세포 배양과 큰 차이가 없었으며, 특히, 탈세포화 조직에서 배양된 세포가 시간이 지남에 따라 점점 조직 내로 침투하여 깊이(Depth)가 깊어지는 것을 확인할 수 있다. 도 7b를 참고하면, 간 조직 내 HT-22 세포가 이탈 없이 안정적으로 존재하였고, 뇌 조직의 경우 성상교세포(astrocyte) 및 뉴런(neuron)이 안정적으로 존재하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 상기 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 조직이 세포배양 지지체로 우수한 효능을 나타낼 수 있음을 시사한다.

[0084] 실시예 5: 조직 이식용 소재로서의 효능 관찰

[0085] 상기 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 조직이 이식용 소재로서 적용될 수 있는지 확인하기 위해, 실시예 1과 동일한 방법으로 제조된 탈세포화 생쥐 신장, 간 및 인간 간 조직을 이식한 후 1주, 3주 및 7주 경과 시점에 각각의 조직을 관찰하였고, 그 결과를 도 8b 내지 8d에 나타내었다.

[0086] 도 8b 내지 8d를를 참고하면 탈세포화 생쥐 신장 및 간 조직뿐만 아니라 인간 간 조직을 이식하는 경우에도 이

식 후 혈관이 생성되었음을 확인할 수 있다.. 또한, 도 8e를 참고하면 탈세포화 조직 내 혈관(CD31) 및 섬유아세포(αSMA)가 생성되었음을 확인할 수 있고, 도 8g를 참고하면 분열하는 세포(Ki67)을 확인할 수 있다. 도 8f를 참고하면, 이식 후 시간이 경과에 따라 점차적으로 탈세포화 조직 내부 깊이 세포가 생성된 것을 알 수 있다.

[0087] 이러한 결과는 상기 실시예 1에 따라 제조된 탈세포화 조직이 이식용 소재로서 우수한 효능을 나타낼 수 있음을 시사한다.

[0089] 실시예 6: 이식된 탈세포화 조직의 조직 재생 효과

[0090] 상기 실시예 5에서 이식된 탈세포화 조직이 정상적인 조직의 재생과정 단계를 진행하고 있는지 여부를 확인하기 위해, 이식 후 3주 및 7주 경과 시점의 조직에 대해 마이크로어레이 분석을 수행하고, 그 결과를 도 9a 내지 9c에 나타내었다. 도 9a 및 9b를 참고하면, 조직섬유화와 관련된 단백질의 mRNA 발현 은 이식 후 3주 대비 7주차에 감소하였고, 세포외기질단백질 관련 mRNA 발현은 종류에 따라 증가하거나 감소하였다. 이러한 결과를 통해, 혈관이 새로 형성되거나 조직 재생이 진행됨에 따라 세포외기질단백질이 증가한 것임을 유추할 수 있다. 또한, 도 9c를 참고하면, 이식된 조직의 면역거부반응은 이식 후 3주 대비 7주차에 전염증성(pro-inflammatory) mRNA 발현은 감소하고, 항염증성(anti-inflammatory) mRNA 발현은 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0092] 실시예 7: 탈세포화 조직의 영상학적 특성 및 관리 특성 확인

[0093] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 생쥐 배아를 탈세포화 한 뒤 뼈를 염색한 후 육안으로 관찰하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 도 9를 참고하면, 하이드로겔 중합체를 전처리하여 조직을 지지한 뒤 탈세포화를 진행하는 경우, 종래 조직 투명화와 같이 굴절률 보정을 거치지 않아도 뼈 구조를 육안으로 명확하게 관찰할 수 있음을 알 수 있다.

[0094] 한편, 상기 탈세포화 생쥐 배아를 탈수화(dehydration)한 뒤 재수화(rehydration)하면서 각 단계별 배아 형태를 육안으로 관찰하고, 면적을 비교하여, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 도 11을 참고하면, 탈수화 및 재수화를 반복하여도 조직이 변형되지 않으므로 멸균, 보관, 운반과 같은 관리 특성을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0096] 실시예 8: 탈세포화 조직의 멸균

[0097] 돼지의 간을 적출하여 생리식염수로 세정한 후, 전체 용액 기준 아크릴아마이드(acrylamide) 10중량%, 비스-아크릴아마이드(bis-acrylamide) 0.1중량%, N,N′-(1,2-디하이드록시에틸렌)비스아크릴아마이드(DHEBA) 0.1중량% 및 열중합 개시제 0.05중량%를 포함하는 혼합 용액에 첨가하여 4℃에서 1일 동안 유지하였다. 이 때, 상기 열중합 개시제로는 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 사용하였다.

[0098] 이후, 혼합 용액을 37℃로 승온하여 중합 반응을 개시하고 2시간 동안 반응을 유지시킴으로써 아크릴아마이드, 비스-아크릴아마이드와 간 조직의 중합 반응으로 형성된 복합체를 수득하였다. 상기 복합체 주변의 하이드로겔을 제거하고, 4% SDS(sodium dodecyl sulfate)용액에 투입하여 1~3일 동안 37℃에서 반응시킴으로써 최종적으로 탈세포화 조직을 제조하였다.

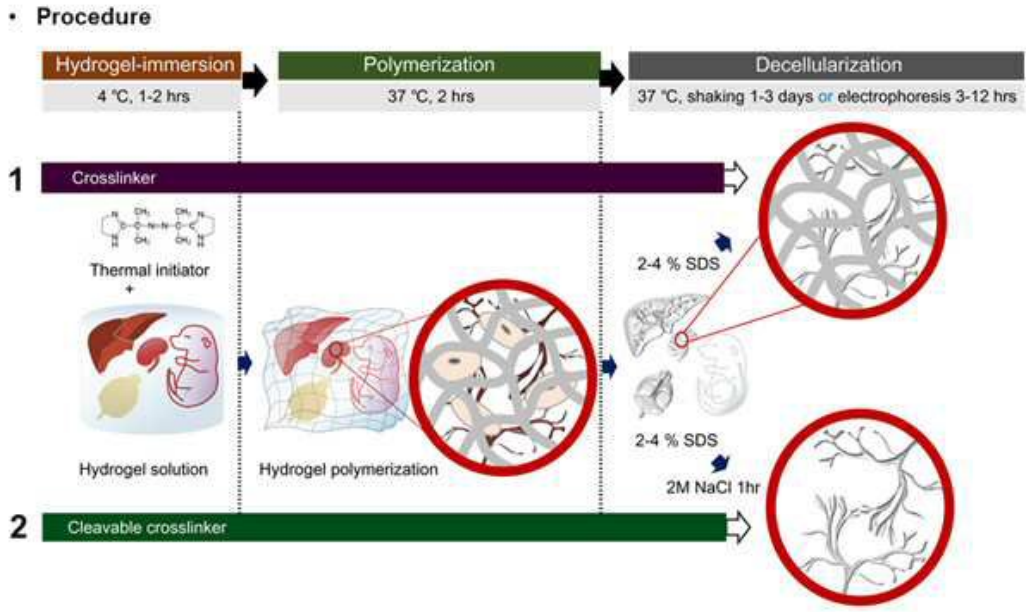
[0099] 상기 제조된 탈세포화 조직의 pH를 12로 조정하여 조직 내 하이드로겔의 가교제를 절단하였다. 가교제의 절단을 통해 조직 내 하이드로겔을 제거(de-gel)함으로써 탈세포화 조직을 멸균하고, 그 결과를 도 12b에 나타내었다.

[0100] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

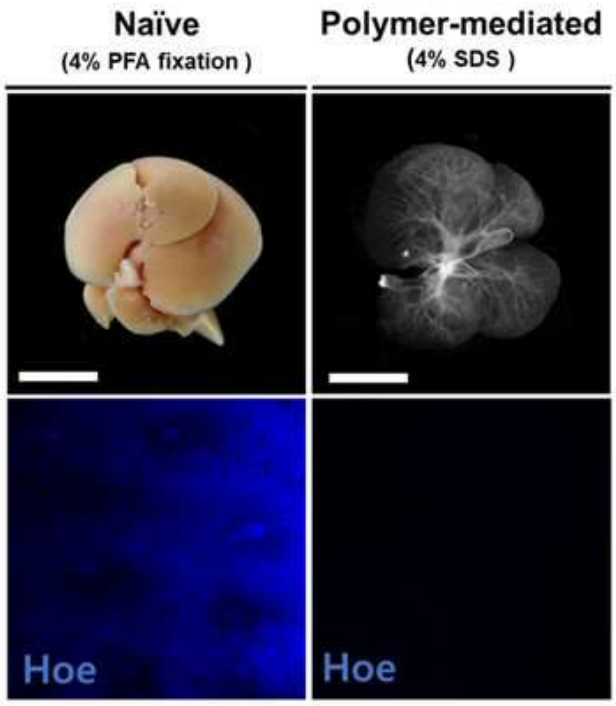
[0101] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

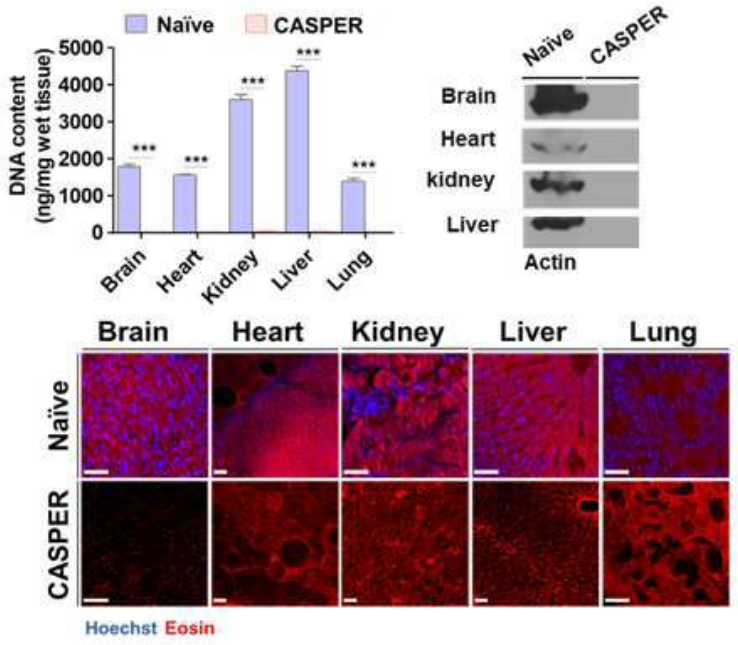
도면1


• Procedure
Hydrogel-immersion
4 ℃, 1-2 hrs
Polymerization
37 ℃, 2 hrs
Decellularization
37 ℃, shaking 1-3 days or electrophoresis 3-12 hrs
1
Crosslinker
Thermal initiator
+
Hydrogel solution
Hydrogel polymerization
2-4 % SDS
2-4 % SDS
2M NaCl 1hr
2
Cleavable crosslinker

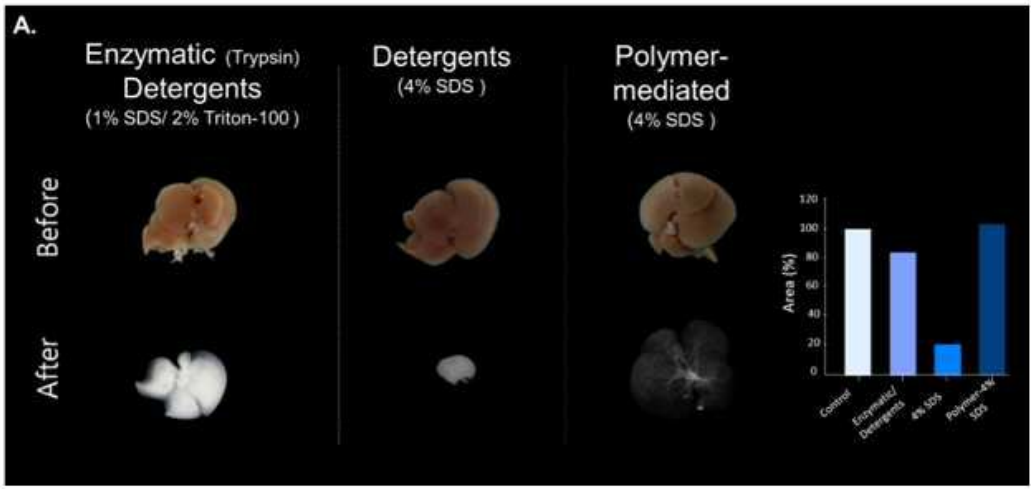
도면2a


Naïve
(4% PFA fixation)
Polymer-mediated
(4% SDS)
Hoe
Hoe

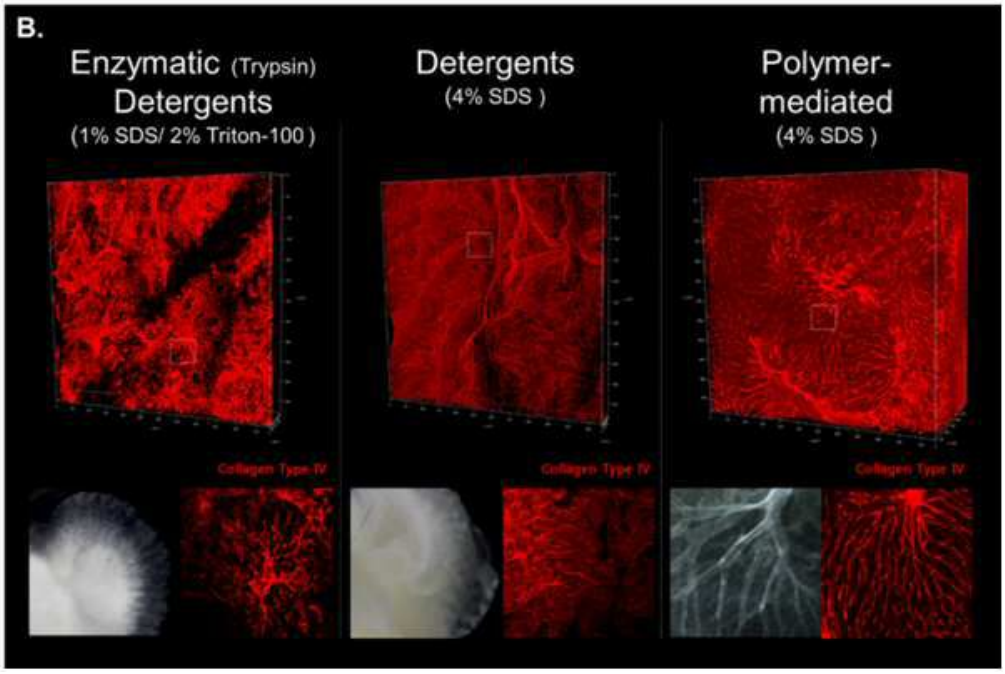
도면2b


Naïve
CASPER
DNA content (ng/mg wet tissue)
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
Brain
Heart
Kidney
Liver
Lung
Naïve
CASPER
Brain
Heart
kidney
Liver
Actin
Brain
Heart
Kidney
Liver
Lung
Naïve
CASPER
Hoechst Eosin

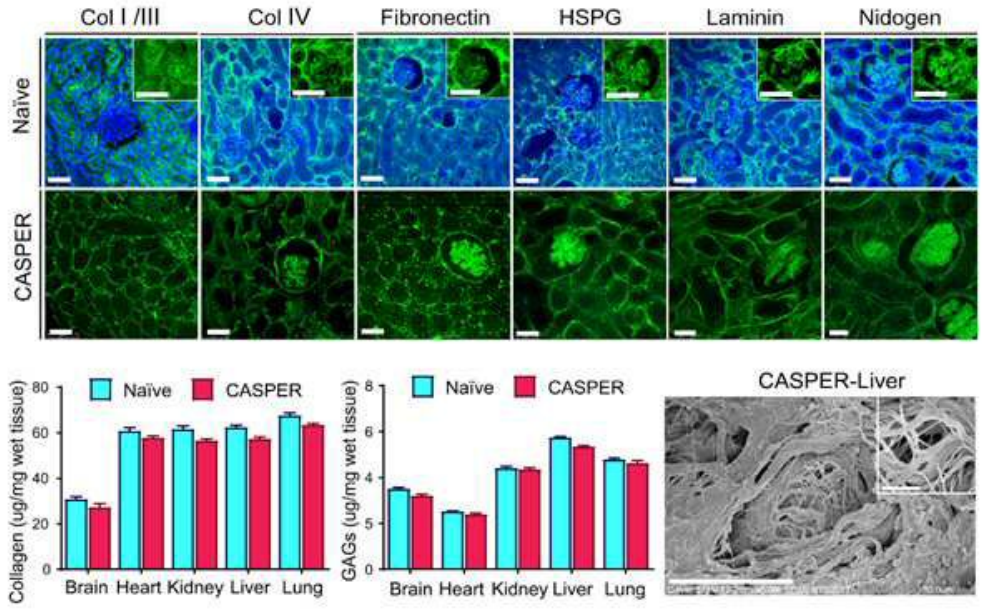
도면3


A.
Enzymatic (Trypsin)
Detergents
(1% SDS/ 2% Triton-100)
Detergents
(4% SDS)
Polymer-
mediated
(4% SDS)
Before
After
Area (%)
120
100
80
60
40
20
0
Control
Enzymatic/
Detergents
4% SDS
Polymer-4%
SDS

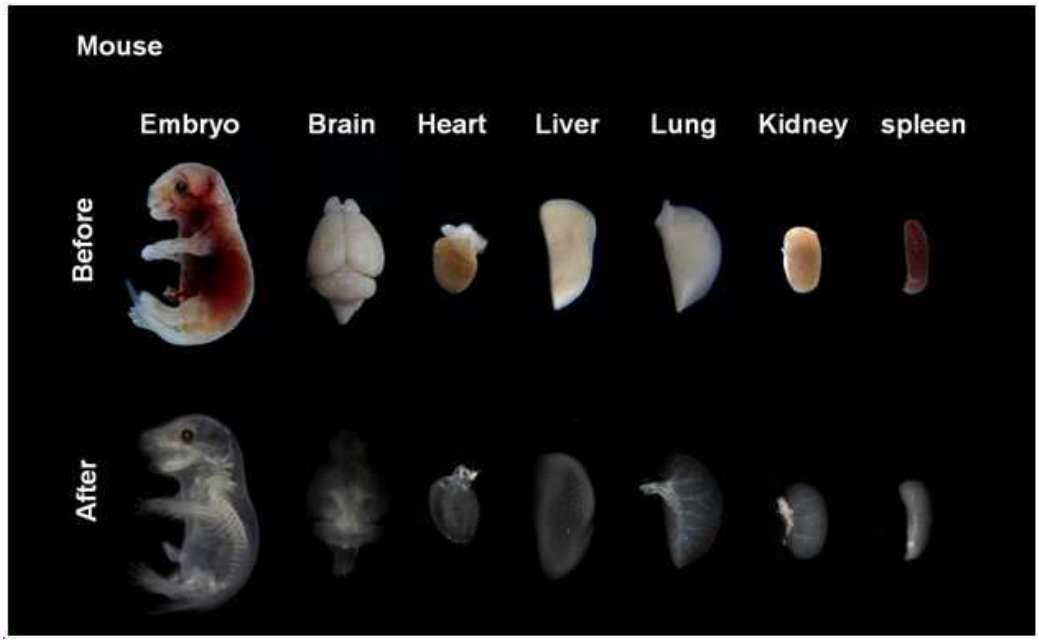
도면4


B.
Enzymatic (Trypsin) Detergents
(1% SDS/ 2% Triton-100)
Detergents
(4% SDS)
Polymer-mediated
(4% SDS)
Collagen Type IV
Collagen Type IV
Collagen Type IV

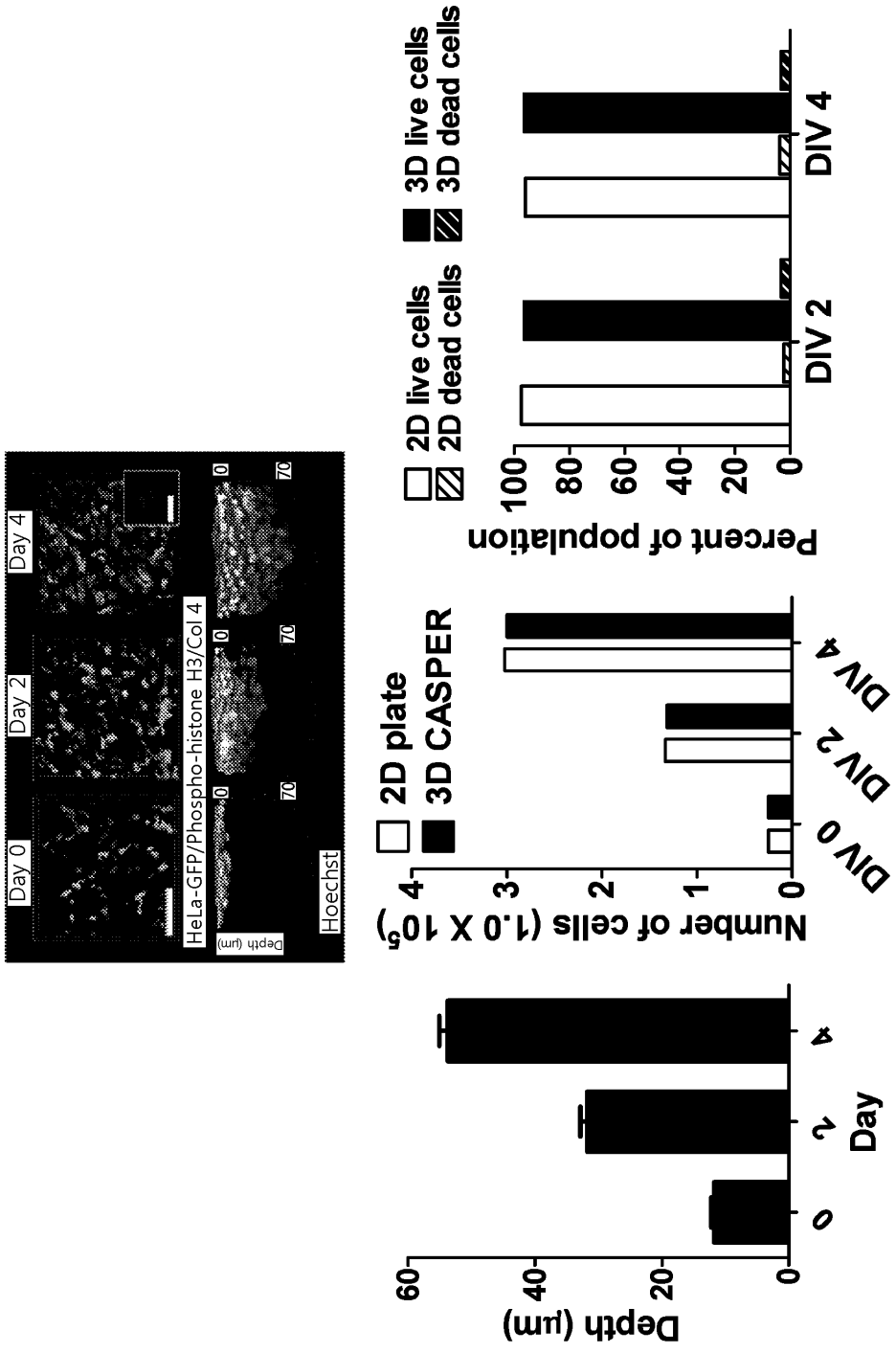
도면5


Col I /III
Col IV
Fibronectin
HSPG
Laminin
Nidogen
Naïve
CASPER
Collagen (ug/mg wet tissue)
Naïve
CASPER
Brain Heart Kidney Liver Lung
GAGs (ug/mg wet tissue)
Naïve
CASPER
Brain Heart Kidney Liver Lung
CASPER-Liver

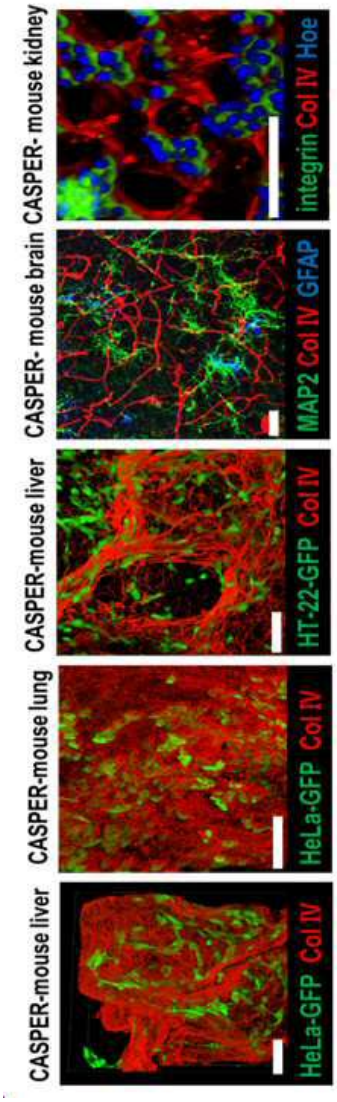
도면6


Mouse
Embryo
Brain
Heart
Liver
Lung
Kidney
spleen
Before
After

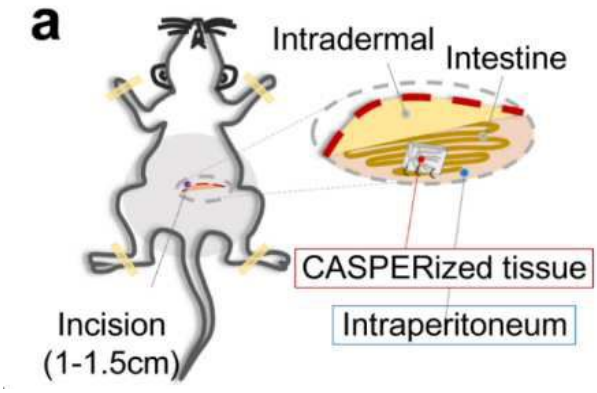
도면7a


Day 0
Day 2
Day 4
HeLa-GFP/Phospho-histone H3/Col 4
Depth (μm)
Hoechst
Depth (μm)
Day
Number of cells (1.0 X 10^5)
2D plate
3D CASPER
DIV 0
DIV 2
DIV 4
Percent of population
2D live cells
2D dead cells
3D live cells
3D dead cells
DIV 2
DIV 4

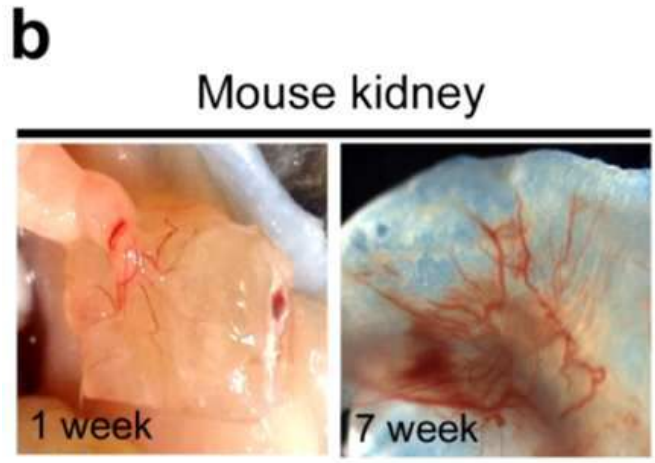
도면7b


CASPER- mouse kidney
integrin Col IV Hoe
CASPER- mouse brain
MAP2 Col IV GFAP
CASPER-mouse liver
HT-22-GFP Col IV
CASPER-mouse lung
HeLa-GFP Col IV
CASPER-mouse liver
HeLa-GFP Col IV

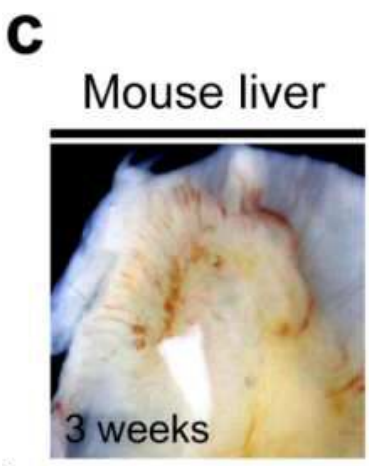
도면8a


a
Intradermal
Intestine
CASPERized tissue
Intraperitoneum
Incision
(1-1.5cm)

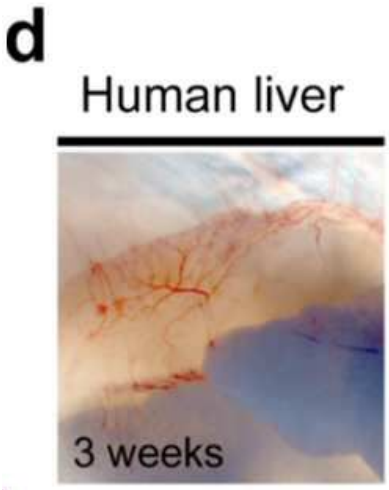
도면8b



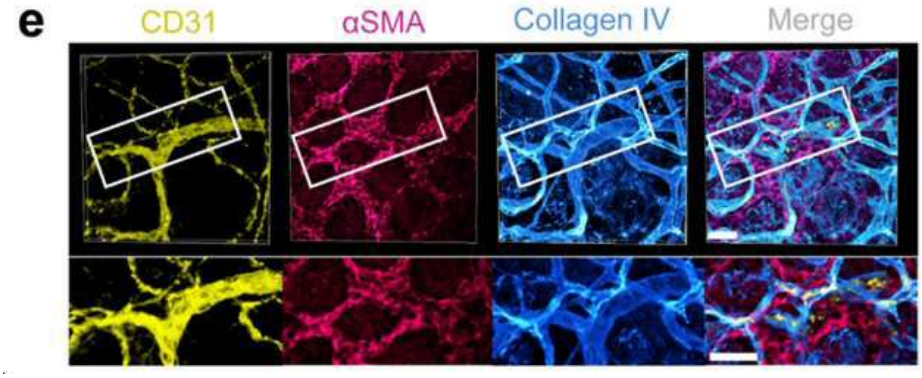
도면8c



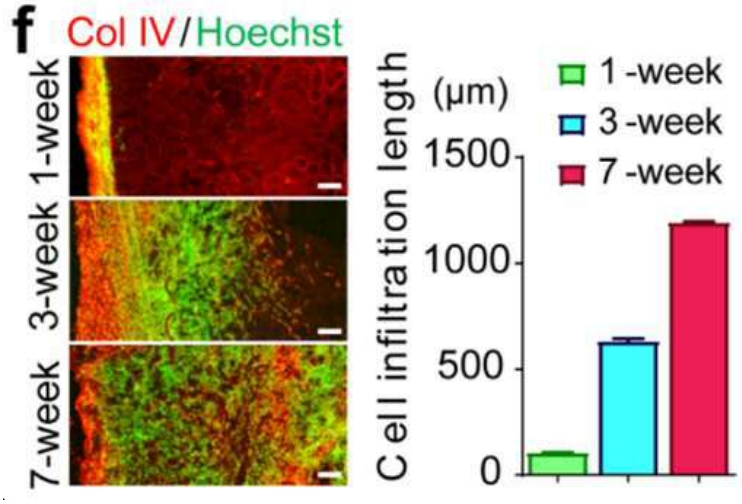
도면8d



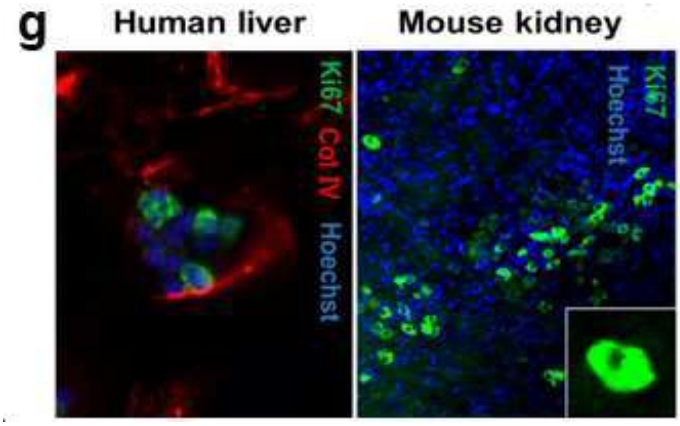
도면8e



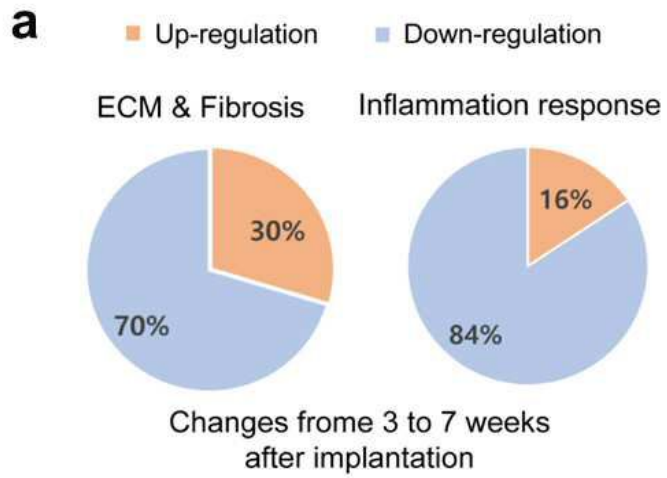
도면8f



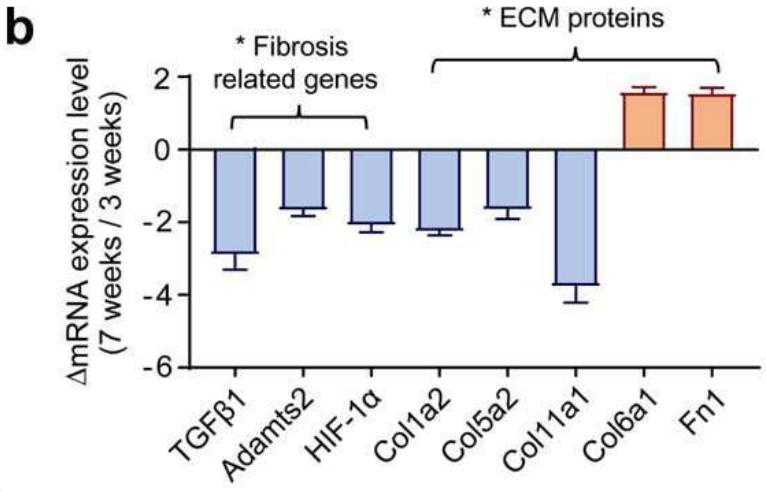
도면8g



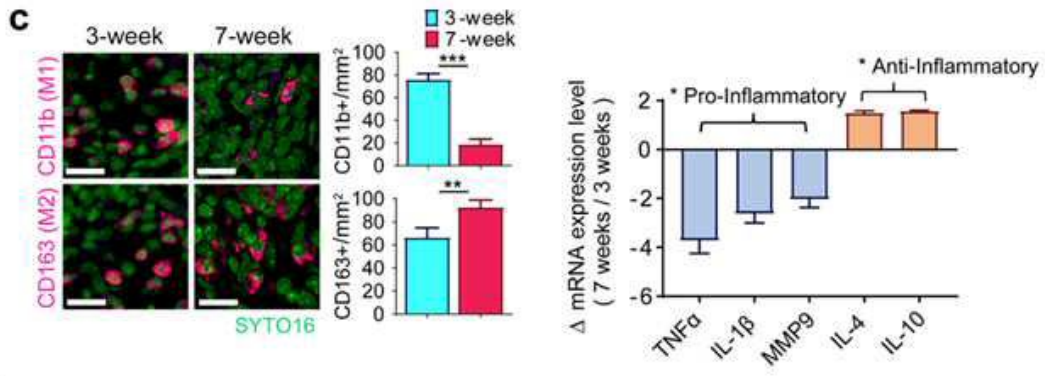
도면9a



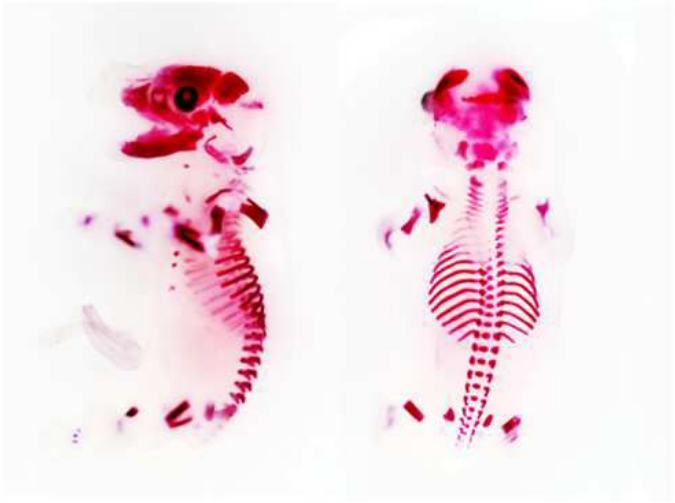
도면9b



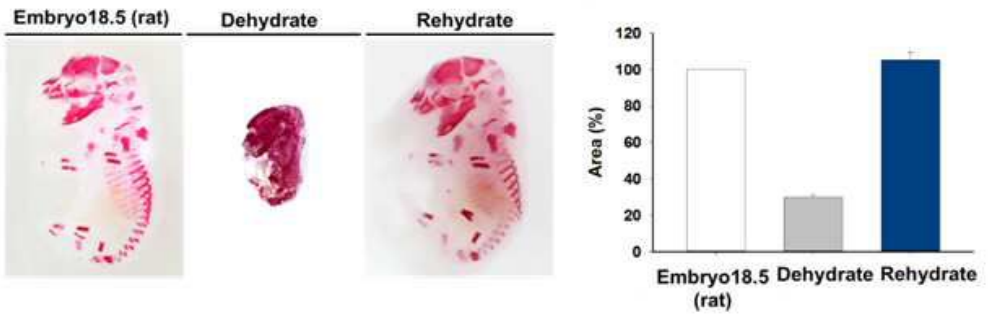
도면9c



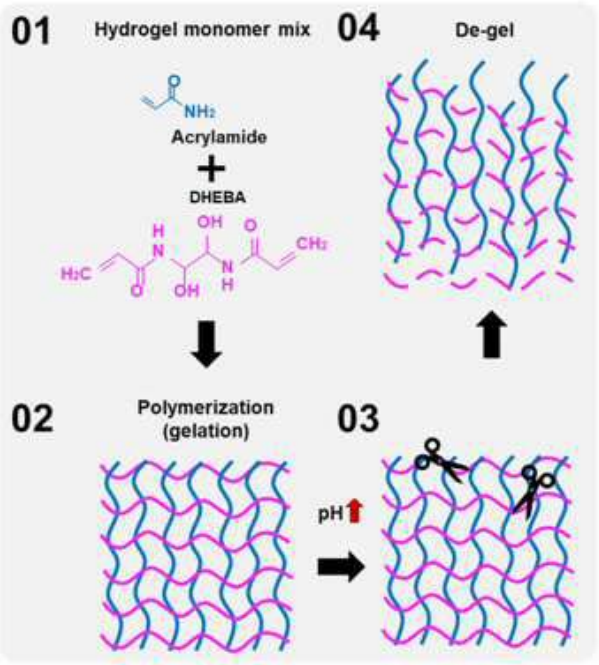
도면10



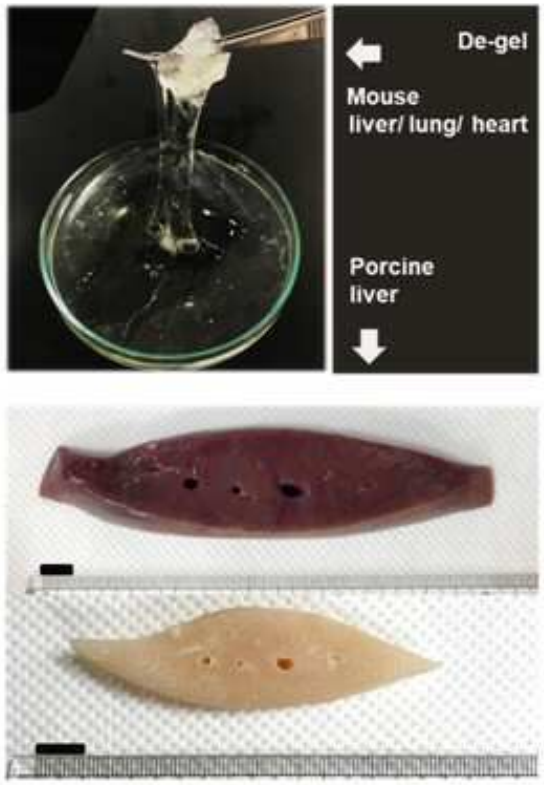
도면11



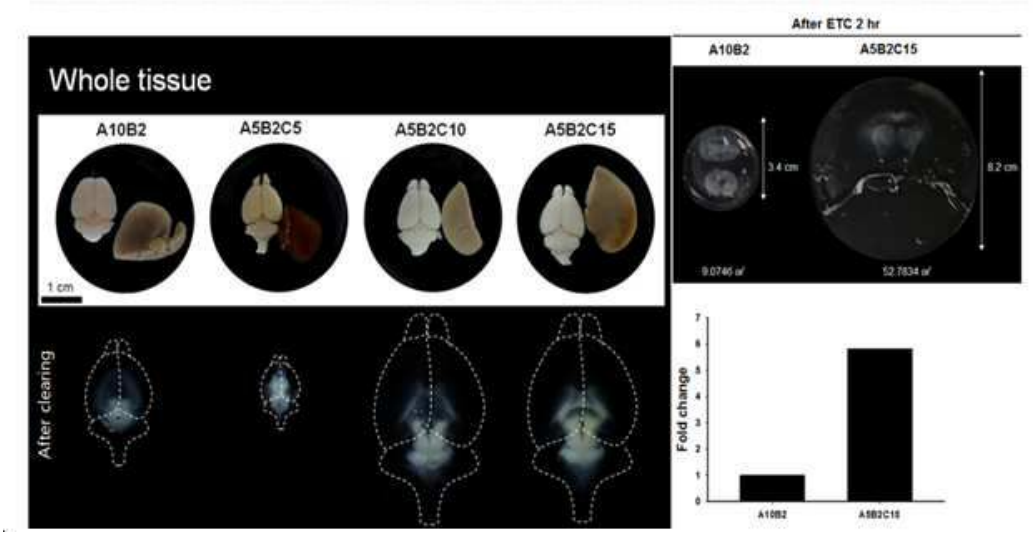
도면12a



도면12b


De-gel
Mouse
liver/ lung/ heart
Porcine
liver

도면13


Whole tissue
A10B2
A5B2C5
A5B2C10
A5B2C15
1 cm
After clearing
After ETC 2 hr
A10B2
A5B2C15
3.4 cm
8.2 cm
Fold change
A10B2
A5B2C15