

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
A61F 2/02

(11) 공개번호   특1999-022216  
(43) 공개일자   1999년03월25일

(21) 출원번호	특 1997-708695		
(22) 출원일자	1997년 12월 02일		
번역문제출일자	1997년 12월 02일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 96/09482	(87) 국제공개번호	WO 96/39101
(86) 국제출원출원일자	1996년 06월 06일	(87) 국제공개일자	1996년 12월 12일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈  국내특허 : 아일랜드 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 뉴질랜드		
(30) 우선권주장	8/470,101 1995년 06월 06일 미국(US)		
(71) 출원인	어드밴스드 티슈 사이언스, 인코퍼레이티드      나우톤 질 케이.  미국, 캘리포니아 92037-1005, 라 졸라, 노스 토레이 파인스로드 10933		
(72) 발명자	노우톤 가일 케이.  미국, 캘리포니아 92037-1005, 라 졸라, 노스 토레이 파인스로드 10933		
(74) 대리인	강명구		

**심사청구 : 없음**

**(54) 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스 조성물과 그 방법**

**요약**

본 발명은 자연적으로 분비되는 사람 세포외 매트릭스로 구성된 조성물과 이 매트릭스를 만드는 방법과 이 매트릭스를 이용하는 방법에 대해 상술하고 있다. 3차원 서포트 구조에 세포를 생장시켜 세포가 세포외 매트릭스를 분비함으로써 세포외 매트릭스를 얻을 수 있다. 그다음 세포를 죽이고, 서포트 구조에서 제거하여 서포트에는 세포외 매트릭스만 남게된다. 세포외 매트릭스를 서포트에서 제거하여, 적절한 제약학적 수용가능한 담체와 복합시켜 환자의 피부에 조직 결함 부위에 주사한다.

**대표도**

**도1**

**명세서**

**기술분야**

본 출원은 미국특허출원 08/470,101(1995. 6.6)의 연속출원이다.

**1. 개요**

본 발명은 연조직의 치료와 복구 및 주름과 반흔과 같은 피부 결함을 치료하는 조성물과 그 방법에 관계한다. 좀더 구체적으로는, 본 발명은 사람 세포외 매트릭스 성분의 주사가 가능한 조성물과 이를 만들고 이용하는 방법에 관계한다. 주사용 조성물은 시험관에서 준비한 3차원 살아있는 기질조직에서 만들 수 있다.

**배경기술**

**2. 발명의 배경**

피하바늘의 발명후에 연조직 증식과 복구를 위한 주사용 물질을 이용한다는 생각이 개발되었다. 연조직과 피부결함을 교정하기 위해 인체에 다양한 물질이 주입되었는데 예를들면 파라핀, 페트로라툼, 식물성 오일, 라놀린, 밀랍 및 실리콘 등을 포함한다. 주사용 액체 실리콘이 가장 광범위하게 이용되었으나, 소결, 붕와 염재발, 피부 궤양등과 같은 장기간에 걸친 부작용으로 인하여 주사용 실리콘의 사용이 감소되고 있다. 또한 네바다주에서는 인체에 주사용 실리콘을 투여하는 것을 불법으로 간주한다. (Orange, Skin and Allergy News(1992) Vol. 23, No.6, pg. 1.). 최근에는 소콜라겐이 연조직 증식을 위한 주사용 물질로 널리 이용되고 있다. 콜라겐은 동물신체의 주요 세포외 구조 단백질이다. 적어도 포유류 콜라겐 14종이 밝혀졌다. 이들의 공통적인 특징은 세가닥 나선으로 알파사슬이라 불리는 세 개 폴리펩티드 사슬로 구성된다. 모든 알파 사슬은 동일한 모양을 가지나, 이들의 아미노산의 조성물과 서열은 상이하다. 이로 인하여 여러 가지 형태의 알파사슬이 형성되나 이들 모두 아미노산 서열은 매년 세 번째 위치에는 글리신을 가진다. 매 3번 위치의 글리신으로 인해 알파사슬이 나선구조를 가진다. 콜라겐 I은 두 개  $\alpha_1$  사슬과 1개의  $\alpha_2$  사슬로 구성되고, 이는 피부, 건, 뼈의 주요 세포외 물질이다. 임상의사들이 콜라겐

이라고 말할 때는 통상적으로 콜라겐 I을 말하는 것이다. 표 1 을 참고하면 콜라겐 I-V 의 상세한 목록과 이들이 발견되는 조직에 대해 상술하고 있다.

콜라겐은 피부, 건, 연골, 뼈와 간질과 같은 경질 또는 연질 연결조직의 대체 또는 증식시키는 이식물질로 이용되어 왔다. 또한, 콜라겐 이식물은 콜라겐이 이식부위에 세포 내부성장을 돕기 때문에 수년간 화장용으로 이용되어 왔다. 초기 콜라겐 이식물은 기계적인 성질을 개선시키고, 면역원성을 감소시키고 재흡착 저항성을 증가시키기 위해 화학물질, 방사 또는 다른 수단으로 연결시킨 고�형 콜라겐 물질이다. 이용된 콜라겐은 다양한 형태로써 교차결합된 그리고 교차결합안된 섬유성 콜라겐, 젤라틴 등이 되고 일부 경우에는 사용하는 용도에 따라 윤활물질, 골형성인자와 같은 다양한 다른 성분이 복합되었다. 고�형의 교차결합된 콜라겐 이식물의 주요단점을 절개에 의해 외과적으로 이식해야 한다는 것이다.

또한, 고�형 콜라겐의 또다른 단점은 변형성과 유연성이 부족하다는 것이다.

Oliver et al., Clinical Orthopaedics Related Research (1976) 115:291-302; Br. J. Exp. Path. (1980) 61:544-549; and Conn. Tissue Res. (1981) 9:59-62는 피부를 트립신으로 처리한 뒤 알데히드와 교차결합시켜 만든 이식물에 대해 상술하고 있다. 생성된 고�형 콜라겐 이식물은 장기간 이식후에도 이들의 고유 물질을 유지하는 것으로 보고되고 있다. 이와같은 고�형 이식물의 주요문제점은 이것 역시 외과적으로 이식해야 한다는 것이다. 또다른 단점은 주사용 이식물질로써의 변형성이 없고 잔류 글루타알데히드는 이식물이 지속적으로 교차결합 하기 때문에 유연성을 상실하는 원인이 된다.

Schechter, et al., Br. J. Plas. Surg. (1975) 28:198-202 는 교차결합후에 L-알라닌에 담군 글루타알데히드 교차 결합된 피부에 대해 상술하고 있다. 문헌에서는 L-알라닌에 피부를 노출시킴으로써 알데히드의 잔류 반응기가 차단되고 따라서 이와같은 기들에 의해 발생하는 독성물질의 방출을 막을 수 있다는 것이다.

외과적으로 이식된 고�형 콜라겐 물질의 또다른 예로는 미국특허 3,949,073 에 상술하고 있다. 미국특허 3,949,073 에서는 연조직을 증가시키기 위해 주사용 이식물질로써 소콜라겐의 아테로펩티드 (atelopectide) 용액을 이용하였다. 이 특허에 따르면, 소 콜라겐은 이식하기전에 재구성되고 이식할 때 조직의 섬유성 물질을 형성한다. 특허에서는 증식부위에서 형성된 섬유성 물질의 주름형성을 조절하기 위해 불용성 소콜라겐 마이크로섬유 입자를 첨가한다고 제시한다. 이 특허에서 상술한 물질의 구체에는 국소 마취제 소량을 포함하는 염에 재구성된 아텔로펩티드로 구성된 것이다. 효과를 나타내는 동안 신체의 체액 성분의 흡수로 인하여 이식후에 이식물의 용량이 감소된다. 따라서, 용량의 지속성이 필수적인 것이라면, 추가 주사 또는 보충적인 이식물질의 주입이 요구된다. 이와같은 특정 조성물은 많은 심각한 단점을 가지는데 사람이 아닌 소에서 얻은 콜라겐이고 준비과정이 상당히 길고 비용이 많이들 뿐만 아니라 마이크로 섬유의 추가도 요구된다는 것이다.

미국특허 4,424,208 에서는 미국특허 3,949,073 의 물질보다는 개선된 용량 지속성을 나타내는 수용성 담체에 재구성된 아텔로펩티드 소콜라겐 섬유와 교차 결합된 아텔로펩티드 소 콜라겐의 주사용 분산액에 대해 상술하고 있다.

미국특허 4,582,640 에서는 미국특허 3,949,073 과 4,424,208 의 것보다 개량된 주사용 이식물에 대해 상술하고 있는데 이때 개선점은 미국특허 4,424,208 과 비교하였을 때 개량된 용량 지속성 및 물리적 변형에 대한 저항성 그리고 미국특허 4,424,208 에서 두 개의 물리적 형태와 비교할 때 소 콜라겐에는 한가지 물리적 형태의 콜라겐만을 포함한다는 것이다.

미국특허 4,803,075 에서는 연조직 복구를 위한 직경이 적은 바늘을 통하여 주사를 하기 위해 윤활제를 포함하는 소 콜라겐 조성물에 대해 상술하고 있다.

전술한 것과 같이 주사용 콜라겐 이식물질의 장점과 전반적인 유용성에도 불구하고 주사용 물질의 생산 및 주사의 연관된 문제가 많다. 예를들면 연조직 복구의 경우에, 섬유성 콜라겐의 현탁액을 이용하여 작은 가우지 바늘을 통하여 치료부위에 조성물을 주사하는 것이다. 주사용 연질 및 경질 조직 이식물 조성물에서 주요 매트릭스 물질로 원섬유 콜라겐의 이용에는 몇가지 제한이 있다. 사람에게 이용할 수 있는 원섬유 콜라겐을 만드는 것이 상대적으로 시간 소모와 비용소모가 크다. 특히, 아테로 콜라겐을 생산하기 위한 면역원 물질과 오염물질의 완전한 제거에는 상당히 복잡하고 고비용의 과정이 필요하다. 또한, 원섬유 콜라겐 조성물의 소멸하지 않고, 모양이 유지되고, 접착성이 있고, 안정성이 있고, 탄성이 있고, 거친 그리고 내구성이 있는 성질을 최적화할 수 없다.

콜라겐 이식물질의 생산과 주사와 연관된 문제에 추가하여 전술한 특허된 주사용 이식물의 실제 이용상의 문제가 많다. 예를들면, 전술한 특허된 주사용 콜라겐은 주소 소 콜라겐과 같은 외인성 소스에서 유도하였기 때문에 면역원성을 감소시키기 위해서는 콜라겐을 수정해야만 한다. 변형된 콜라겐의 경우에도, 이식물질은 여전히 면역원성이 있기 때문에 일부 사람은 소 콜라겐에 대해 이미 알레르기를 가지거나 또는 시간이 지남에 따라 알레르기 반응을 일으킬 수 있다. 이와같은 알레르기 반응 때문에 전술한 주사용 콜라겐 이식물은 많은 사람에게 제공될 수 없고 다른 일부 사람들도 일련에 단 세차례만 주사를 허용받는다. 심각한 알레르기 반응에는 류마티스 관절염 증상을 포함하고, 비교적 약한 반응에는 주사부위가 붉어지고 붓어오르는 것을 포함하는데 이는 영구적인 반응이 될 수 있다. 이와같은 심각한 부작용으로 인하여 전술한 주사용 콜라겐은 입술 증시에는 더 이상 이용되지 않고 있다. 또한 외인성 주사용 콜라겐과 연관된 문제점은 주사용 콜라겐 보다 다루기 힘들어 생체적응성이 있는 세라믹 매트릭스가 주입되어 유사한 결과를 얻을 수 있다고 상술하고 있다.(미국특허 5,204,382).

요약하면, 지속성이 결여된 연조직 결함을 치료하기 위한 전술한 주사용 조성물의 단점으로 인하여 반복된 주사의 필요성, 부작용극복, 연조직 증식을 위한 새로운 주사용물질이 필요하다.

### 3. 발명의 요약

본 발명은 연조직 증식을 위한 주사용 물질에 관계하고, 이의 제조와 이용 방법에 관계하는데 이는 선행 기술의 주사용 소 콜라겐, 실리콘을 포함한 다른 주사용 물질의 단점을 극복한 것이다. 본 발명에 따라 이용된 주사용 물질은 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스 물질과 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭

스에서 유도한 물질로 구성된다. 이와같은 물질은 생체 적응성이 있고 생체 분해될 수 있으며, 연조직 침착, 맥관형성, 상피형성, 섬유증식을 촉진시킬 수 있어 피부와 다른 조직 결함을 복구하는데 유용하다. 이와같은 세포와 매트릭스 준비물은 이용하여 결함이 있는 부위에 주사하여 피부 결함을 복구한다.

본 발명의 주사용 물질은 피부 결함의 복구에 이용된 통상의 주사용 콜라겐 물질보다 많은 장점을 가진다. 본 발명의 세포와 매트릭스 물질은 오로지 사람 단백질만을 포함하기 때문에 외부 단백질 또는 펩티드 특별하게는 통상적인 주사용 콜라겐 물질에서 볼 수 있었던 소 콜라겐에서 볼 수 있는 것과같은 면역반응으로 인하여 면역반응의 위험이 줄어들었다. 또한, 본 발명의 주사용 물질은 상당히 지속성이 증가되어 비록 여러번의 주사가 요구되더라도, 면역원성이 결여되어 소 콜라겐 조성물에 적용되었던 일년에 3회이상 주사금지 조항을 따르지 않아도 된다. 본 발명에서 제공하는 또다른 장점은 고유 세포와 매트릭스 조성물에는 피하 세포에서 유도된 세포와 매트릭스에는 생리학적으로 정상 조건의 조성물과 상당히 유사한 세포와 매트릭스 단백질, 콜라겐 I, III, 히알루론산을 포함하고 다양한 글리코아미노글리칸과 천연 성장인자도 포함한다. 이들 세포와 매트릭스 단백질과 성장인자의 대부분에 대해 상당히 연구가 많이 되었고 상처 치유와 조직 복구에 중요한 것으로 밝혀졌다.

본 발명의 다른 측면에서, 준비물은 시험관내 조직 배양을 위한 개량된 시스템에 이용될 수 있다. 구체예에서, 3차원 구조에 피복된 자연적으로 분비되는 세포와 매트릭스는 통상적인 조직배양 용기에서 접착 없이 성장시키기 위해 서포트에 부착을 요구하는 세포를 배양하는데 이용될 수 있다. 피복된 구조에서 세포를 배양하는데 추가하여, 구조에 있는 세포에 의해 분비된 세포와 매트릭스를 모아서 이를 이용하여 조직배양물에 이용되는 용기를 피복한다. 기본적인 기질로 작용하는 세포와 매트릭스는 세포가 정상적으로 통상적인 조직 배양 접시 바닥 기질에 부착하여 성장할 수 없는 세포를 부착 성장하게 한다.

본 발명의 다른 구체예에는 특정 세포의 세포 주성 능력을 결정하는 신규한 방법을 제공한다. 이 방법은 문제의 세포형을 고유 세포와 매트릭스가 피복된 3차원 구조물에 접종하고, 시간이 지남에 따라 구조물에서 세포가 이동하는 거리를 측정하는 것이다. 세포와 매트릭스는 구조물에 있는 세포에 의해 자연적으로 분비되기 때문에 신체에서 발견되는 세포와 매트릭스의 우수한 시험관용 등가체인 것이다. 예를들면 이와같은 검사를 통하여 분리된 종양세포가 전이성이 있는지 또는 특정 면역 세포가 이동하는지 또는 구조물에서 화학주성이 있는지를 알 수 있고 이로 인하여 세포는 이와같은 세포 주성을 가지는 지를 알 수 있다.

### 3.1. 정의와 약어

여기에서 사용되는 다음의 용어는 지적인 것과 같은 의미를 가진다.

접착층: 매트릭스에 직접적으로 부착할 수 있는 세포의 부착에 의해 간접적으로 연결된 또는 3차원 구조에 직접적으로 부착된 세포들.

제약학적으로 수용가능한 운반체; 생리적 등장성과 pH를 가진 수용성 매체로써 국소 마취제와 유동성 운반체와 같은 다른 성분을 포함할 수 있다.

기질세포: 성질 연조직에서 발견되는 원소 및 세포 있는/또는 없는 섬유아세포, 내피세포, 혈관주위세포, 대식세포, 단세포, 혈장세포, 비만 세포, 지방세포, 연골세포등.

3차원 구조물; 임의 물질 또는 모양으로 구성된 3차원 서포트로써 (a) 세포가 이에 부착할 수 있거나(세포가 부착할 수 있도록 변형될 수 있고); 그리고 (b) 세포가 한 층이상으로 자라게 할 수 있다. 기질세포를 서포트에 접촉시켜 살아있는 기질 매트릭스를 만들 수 있다.

살아있는 기질조직; 기질세포가 접종된 3차원 구조물. 합류 또는 준합류에 따라 기질세포는 성장과 분열을 지속한다. 시험관에서 준비한 살아있는 기질조직은 본 발명의 주사용 조성물에 이용되는 세포와 매트릭스 단백질의 원료이다.

다음의 약어는 지시한 의미를 가진다.

EDTA : 에틸렌 디아민 테트라아세트산.

FBS : 태아 소혈청.

HBSS : Hank's 균등 염 용액.

HS ; 말 혈청.

MEM : 최소 필수 배지.

PBS : 인산 완충 염.

RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute Medium NO. 1640(GIBCO. Inc., Grand Island, NY).

SEM : 스캐닝 전자 현미경

본 발명은 다음의 상세한 설명, 특정 구체예 및 첨부도면을 참고로 하여 충분히 이해될 수 있는데 본 발명을 이에 한정시키는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

도 1 은 메쉬 구멍을 가로질러 세포의 연장과 3차 구조물에 부착된 섬유아세포를 나타낸 스캐닝 전자 현미경 사진이다. 섬유아세포는 활동적으로 분비되는 매트릭스 단백질이고 조직-특이적 세포로 접촉하기 전에 수득될 수 있는 준합류 단계이다.

도 2A-D 는 시험관에서 성장시킨 피부 조직(도 2A-B) 또는 정상 성인 피부 샘플(도 2C-D)에서 만든 세포와 매트릭스에서 분리된 콜라겐의 전자현미경 사진이다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명의 한 구체예는 피부 결함을 치료하기 위한 주사용 매트릭스 조성물과 이의 용도에 관계한다. 세포와 매트릭스 단백질은 3차원 구조물에 기질세포를 성장시켜 다층의 세포 배양 시스템이 되어 시험관에서 만든 살아있는 기질조직에서 유도된 것이다. 통상적인 조직 배양 시스템에서는 세포는 단층으로 성장한다. 본 발명에 따르면, 3차원 구조물에 있어 성장한 세포는 다층으로 성장하여 세포 매트릭스를 만든다. 이와같은 매트릭스 시스템은 기존의 단층 조직 배양 시스템보다 생체에서 만날 수 있는 생리적 조건에 한층 더 근접한 것이다. 3차원 세포 배양 시스템은 여러 가지 형태의 기질세포의 증식과 피부, 골수 기질, 선 세포, 연골 등을 포함하나 이에 한정되지 않은 여러 가지 상이한 기질조직을 만드는데 이용할 수 있다.

본 발명에 따르면, 미리 만든 살아있는 기질조직은 3차원 구조에서 성장한 기질세포로 구성된다. 기질세포는 여기에서 충분히 설명하는 것과 같은 추가 세포 또는 원소 유무에 관계없이 섬유아세포로 구성된다. 기질로 구성된 섬유아세포 및

다른 세포 /또는 원소는 태아 또는 성인의 것일 수도 있고 피부, 간, 체장과 같은 통상적인 원에서 유도될 수 있다. 조직과 기관은 적절한 생검 또는 부검에 의해 얻을 수 있다. 사실 사체 기관을 이용하면 기질 세포와 원소를 일반적으로 공급할 수 있다.

일단 3차원 구조물에 접종한 후에, 기질세포는 구조물에서 증식하고 서포트에 침착된 성장인자, 조절인자와 세포외 매트릭스 단백질을 만든다. 살아있는 기질 조직은 상당시간 동안 배양물의 활성적인 증식을 유지한다. 성장과 조절인자를 배양물에 추가되고 이들이 기질 서포트 매트릭스에 의해 만들어지기 때문에 필요하지 않을 수 있다.

자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스는 3차원 구조물에서 모아지고 제약학적으로 수용가능한 수용액 담체와 함께 처리하고, 얼굴피부와 같은 조직에서 생체물질의 정확한 위치에 주사기를 넣는다.

본 발명은 생체분해되는 또는 생체-분해되지 않은 3차원 서포트 구조에서 사람 기질세포 동안에 세포는 정상적인 사람 조직에서 생산된 사람 세포외 매트릭스에 3차원 서포트 구조에 합성되고 침착되는 것으로 개발되는 것으로 보인다. 세포외 매트릭스는 세포에 국소적으로 분비되고, 세포와 조직이 함께 결합되고 또한, 이와 접촉하는 세포의 개발과 동향에도 영향을 준다. 세포외 매트릭스에는 글리코사미노글리칸 사슬 네트워크로 구성된 수화된 겔에서 짜여진 다양한 섬유를 이루는 단백질을 포함한다. 글리코사미노글리칸은 긴 음전하를 띤 폴리사카라이드 사슬로된 이형기이고 이는 프로테오글리칸 분자를 만들기 위해 단백질에 공유결합된다. (히알루론산 제외).

섬유-형성 단백질은 두가지 기능형을 가지는데; 주로 구조적인 것(콜라겐과 엘라스틴) 및 접착성을 가지는 것(피브로넥틴과 라미닌)으로 나누어진다. 원섬유 콜라겐(I, II, III)은 세포외 공간에서 간-케이블 형태의 섬유로 뭉쳐지는 로프형의 3중 나선 분자이고 이들은 다시 다양한 배열로 합체된다. 콜라겐 IV는 기저 라이나의 코어를 만드는 쉬트형 메쉬워크로 합체된다. 엘라스틴분자는 상당한 코어가 연결된 섬유 네트워크와 쉬트를 만드는데 이는 뻗어나가고 다시 감길 수 있으며 이로 인해 매트릭스는 탄성을 부여받게 된다. 피브로넥틴과 라미닌은 매트릭스에서 상당히 큰 접착성 당단백질이고; 피브로넥틴은 연결조직에 광범위하게 분포되어 있는 반면 라미닌은 기저 라미나에서 주로 발견된다. 이들의 다중 결합 도메인 수단에 의해 이와같은 단백질은 세포가 부착되어 세포외 매트릭스를 만들게 된다.

예를들면, 자연적으로 분비되는 사람 피부 세포외 매트릭스에는 콜라겐 I, III, 피브로넥틴, 테나신, 글리코사미노글리칸, 산성 및 염기성 FGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , KGF, 데코린 및 다양한 다른 분비된 사람 피부 매트릭스 단백질을 포함한다. 자연적으로 분비되는 단백질로써, 다양한 세포외 매트릭스 단백질이 상당량 생성되고 이는 생체내에 존재하는 것과 유사한 비율이다. 또한 3차원에서 기질세포의 생장은 단층 시스템에서 보다는 더 긴 시간동안에 배양물에 세포의 활동적인 증식을 유지시킨다. 또한 3차원 시스템은 생체에서 발견되는 부분에 유사한 성인 조직의 성분을 만들기 위해 시험관 배양물에서 세포의 성숙, 분화 및 분리를 지원한다. 따라서, 배양물에서 세포에 의해 만들어지는 세포외 매트릭스는 고유조직에 한층 더 가깝다.

출원인이 본 발명의 작업에 의한 메카니즘을 설명해야할 의무는 없지만, 3차원 배양 시스템에 고유의 다수 인자가 3차원 배양 시스템의 이와같은 특징에 기여한다;

- 3차원 구조는 단백질 부착을 위한 더 큰 표면적을 제공하여 결과적으로 기질세포의 흡착을 가능하게 하고;
- 3차원 구조로 인하여, 기질세포는 단층 배양물에 있는 세포와는 대조적으로 왕성하게 성장을 지속할 수 있고, 성장하여 함유되고, 접촉 저해성을 나타내고, 성장 및 분열이 중단된다. 기질세포의 복제에 의해 성장과 조절인자의 노력은 배양물에서 세포의 증식을 자극하고 분화를 조절하는 것이다.
- 3차원 구조물은 생체 조직에서 발견되는 것에 상당히 유사한 세포 원소의 공간적인 분포를 허용한다.
- 3차원 시스템에서 세포 성장을 위한 공간의 증가로 인하여 생체에서 발견되는 고유 부분에 유사한 국소화된 미소환경을 만들 수 있다.
- 3차원 매트릭스는 생식세포, 단세포와 접착층에 있는 임파세포와 같은 이동성 세포의 이동가능성의 증가시켜 세포-세포 상호작용을 최대화한다.
- 분화된 세포 표현형의 유지는 성장/분화 인자를 요구하고, 적절한 상호작용도 요구하는 것으로 알려져 있다. 본 발명은 기질조직의 미소 환경을 효과적으로 만든다.

아래에서는 3차원 기질 서포트, 배양시스템 자체, 이의 유지 및 3차 배양물의 다양한 용도와 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스의 다양한 용도에 대해서 상술하고자 한다. 설명의 용이성을 위해서, 본 발명의 상세한 설명은

- i) 3차원 기질 세포 배양물의 생장,
- ii) 자연적으로 분비된 사람 세포외 매트릭스의 분리; 그리고
- iii) 분리된 세포외 매트릭스의 구성물을 연조직 결합부위에 주사용 조성물로 조성으로 분류하여 설명하고자 한다.

#### 5.1. 시험관에서 살아있는 기질조직의 준비

기질조직을 배양하는데 이용되는 3차원 서포트는

- a) 세포가 부착할 수 있는(또는 세포가 부착할 수 있도록 변형될 수 있는); 그리고
- b) 세포가 한층 이상으로 성장할 수 있도록 하는 임의 물질 또는 모양이 될 수 있다.

생체 비-분해성 또는 생체분해성 물질과 같은 구조물을 만드는 데에는 여러 가지 상이한 물질이 이용된다. 예를들면, 생체 비-분해성 물질에는 나일론(폴리아미드), 다크론(폴리에스테르), 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물(예로써 폴리비닐 클로라이드), 폴리카보네이트(PVC), 폴리테트라플로오르에틸렌(PTFE; 테플론), 테르마낙스(TPX)등을 포함하나 이에 한정시키지 않는다. 또한 생체 분해성 물질에는 니트로셀룰로오스, 면, 폴리글리콜산(PGA), 고양이 내장 봉합사, 셀룰로오스, 겔라틴, 맥스트란, 키토산, 히알루론산 등을 포함하나 이에 한정시키지 않는다. 생체 분해성 또는 비-분해성 물질을 메쉬로 직조하여 3차원 구조물을 만든다. 또한, 콜라겐 스폰지와 같은 스폰지 등의 다른 3차원 구조물을 만드는데 이용할 수도 있다.

나일론, 폴리스티렌 등과 같은 일부 물질은 세포가 부착하기에 부적합하다. 이들물질이 3차원 서포트 구조로써 이용되는 경우에, 구조에 기질세포의 부착을 강화시키기 위해서는 기질세포 접촉전에 구조를 선처리하는 것이 좋다. 예로써, 기질세포를 접촉하기 전에 나일론 구조물은 0.1M 아세트산으로 처리하고 나일론에 피복시키기 위해 폴리리신, FBS, 또는 콜라겐에서 배양시킨다. 폴리스티렌은 설퍼산을 이용하여 유사하게 처리한다. 본 발명에 이용된 통상적인 나일론 메쉬는 Nitex 로써 나일론 여과 메쉬는 포어 크기가 210 $\mu$ m이고 평균 나일론 섬유 직경이 90 $\mu$ m(#3-210/36 Tetko, Inc. N.Y)이다.

성인 또는 태아 조직에서 유도된 섬유아세포와 아래에서 상술하는 것과 같은 다른 세포 또는 원소가 포함된 또는 없는 것으로 구성된 기질세포를 구조물에 접종한다. 이와같은 섬유아세포는 피부, 간, 체장 등과 같은 기관에서 유도할 수 있고 이는 생검 또는 부검을 이용하면 된다. 사실 섬유아세포는 적절한 사체 기관에서 다소 편리하게 다량 구할 수 있다. 구체예에서 태아 섬유아세포는 표피에서 다량 구할 수 있다.

섬유아세포는 섬유아세포의 원료가 되는 적절한 기관 또는 세포를 분해하여바로 분리할 수 있다. 본 기술에 통상적인 기술을 이용하여 용이하게 실시할 수 있다. 예를들어 조직 또는 기관은 인접세포간의 상호연결을 약화시키는 분해 효소 또는 킬레이트 제로 처리하거나 기계적으로 분해하여 조직을 적절한 세포 절단없이 개별세포 현탁액에 분산시킬 수 있다. 효소에 의한 조직을 절단하고 분해효소 단독 또는 이를 복합하여 절단된 조직을 처리하여 이루어질 수 있다. 여기에는 트립신, 키모트립신, 콜라게나제, 엘라스타제, 히알루로다제, DNase, 프로나아제 또는 디스파제를 포함하나 이에 한정시키지 않는다. 기계적인 파괴는 연마기, 분쇄기, 체, 균질화기, 압력세포, 초음파 분쇄기를 포함하나 이에 한정되지 않은 수단을 이용하여 이루어질 수 있다. 조직 분해기술은 Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 2d Ed., A.R. Liss, Inc., New York, 1987, Ch. 9, pp. 107-126에서 상술하고 있다.

조직이 개별 세포 현탁액으로 되면, 현탁액은 부집단으로 분별시키고 여기에서 섬유아세포 및 다른 기질 세포 또는 원소를 구할 수 있다. 이는 특정 세포형의 클로닝의 선택, 원하지 않는 세포의 선택적 파괴(네가티브 선택), 혼합된 집단에서 상이한 세포 응집성에 기초한 분리, 냉동-해동과정, 혼합된 집단에서 세포의 차등적인 흡착 성질, 여과, 통상적인 그리고 지역적인 원심분리, 원심성-일루트리에이션(반-기류 원심분리), 단위 중량 분리, 반전류 분포, 전기 청공법 및 형과 활성화된 세포 소프 등을 포함하나 이에 국한시키지 않는다. 클론성 선택과 세포분리 기술에 대해서는 Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Techniques, 2d Ed., A.R. Liss, Inc., New York, 1987, Ch. 11 and 12, pp. 137-168를 참조한다.

예를들면 섬유아세포의 분리는 다음과 같이 실시한다. 새로운 조직 샘플을 혈청을 제거하기 위해 Hank's 균등 염용액(HBSS)으로 완전히 세척하고 절단한다. 절단된 조직은 트립신과 같은 미리 준비한 분해 효소액에서 1~12 시간 배양시킨다. 이와같은 배양후에, 분리된 세포는 현탁시키고, 원심분리에 의해 펠렛화시키고, 배양접시에 도말한다. 모든 섬유아세포는 다른 세포보다 먼저 부착되어 적절한 기질 세포를 선택적으로 분리 생장시킬 수 있다. 분리된 섬유아세포는 함유한때까지 생장시키고, 함유 배양물로 부터 들어내어 3차원 구조물에 접종한다(Naughton et al., 1987, J. Med. 18(34): 219-250). 약  $10^6 \sim 5 \times 10^7$  세포/ $m^2$ 의 상당히 높은 농도의 기질세포를 3차원 기질 서포트를 만들 수 있다.

섬유아세포에 추가하여, 다른 세포를 첨가하여 3차원 기질세포 배양물-세포외 매트릭스를 생산하는-을 만들 수 있다. 예를들면 성인 연조직에서 볼 수 있는 다른 세포를 섬유아세포와 함께 3차원 서포트 구조물에 접종한다. 이와같은 세포에는 내피세포, 혈관주위세포, 대식세포, 단세포, 혈장세포, 비만세포, 지방세포, 연골세포 등을 포함하나 이에 국한시키지 않는다. 이와같은 기질세포는 전술한 공지의 방법을 이용하여 피부, 간등과 같은 적절한 기관에서 바로 얻을 수 있다.

본 발명의 한 구체예에서, 배양될 특정 조직에 특징화된 기질조직을 섬유아세포 기질에 추가하여 조직형에 특이적인 세포외 매트릭스를 만들 수 있다. 예를들면 피부 섬유아세포를 이용하여 시험관에서 피부-특이적인 세포외 매트릭스의 생산을 위한 3차원 준함류 기질을 만든다. 또는 섬유아세포 내피세포, 대식세포/단세포, 지방세포와 망상 세포와 같은 조혈성 조직의 기질세포를 이용하여 시험관에서 골수-특이적 세포외 매트릭스의 생산을 위한 3차원 준-함류 기질을 만든다. 조혈성 기질 세포는 3000 $\times$  g와 같은 저속에서 원심분리에 의해 골수현탁액에 있는 연막에서 바로 얻을 수 있다. 간 기질 세포는 섬유아세포, Kupffer 세포와 맥관 및 담즙관 내피세포를 포함한다. 유사하게 선 세포를 이용하여 신경조직과 세포의

증식을 지원할 수 있다.

배 또는 성인뇌를 트립신 또는 콜라제나제 처리하여 이 목적을 위해 선 세포를 얻을 수 있다. Ponten and Westermark, 1980, In Federof, S. Hertz, L., eds, Advances in Cellular Neurobiology, Vol. 1, New York, Academic Press, pp. 209-227.

생체에서 이용하기 위해서는 환자 고유 조직에서 기질세포를 얻는 것이 바람직하다. 3차원 기질 서포트 구조에 있는 세포의 생장은 기질에 다음의 물질을 추가하거나 기질을 물질로 피복시키면 강화될 수 있는데 이때 물질로는 콜라겐, 엘라스틴 섬유, 망상섬유, 당단백질과 같은 단백질; 헤파린 설페이트, 콘드로이틴-4-설페이트, 콘드로이틴-6-설페이트, 더마탄 설페이트, 케라탄 설페이트와 같은 글리코사미노글리칸; 세포외 매트릭스 또는 다른 물질등이 된다.

기질세포의 접종후에, 세포분열을 촉진시키는 것과 같은 세포 성장에 적합한 생리학적 조건하에서 적절한 영양배지를 이용하여 3차원 구조물을 배양한다. 사용하기에 적합한 배지로는 RPMI 1640, Fisher's, Iscove's, McCoys' 배지등이 있다. 중요한 것은 증식활성을 최대화시키기 위해 배양기간동안에 배지에 3차원 기질 배양물을 현탁시키거나 부유시켜야 한다. 또한 배양물은 소모된 배지를 제거하기 위해 그리고 방출된 세포를 집단을 이루지 못하도록 새로운 배치를 주기적으로 공급한다.

배양기간 동안에 기질 세포는 구조물의 입구에서 생장을 시작하기 전에 선형으로 생장하고 3차 구조물을 에워싼다. 세포는 적절한 수준으로 생장하여 세포외 매트릭스 단백질이 적절히 침투하게 한다.

구조물의 입구는 기질 세포가 입구를 가로질러 이어나갈 수 있도록 적절한 크기를 가져야 한다. 구조물을 가로 질러 이어지는 활동적으로 생장한 기질 세포를 유지하여 기질세포에 의해 만들어지는 성장인자의 생산을 강화시켜 장기적 배양물을 서포트 한다. 예를들면, 입구가 너무 적은 경우에, 기질세포의 합류가 너무 신속하게 일어나서 메쉬로부터 용이하게 떼어낼 수 없다. 포획된 세포는 접촉 저해성을 나타내어 증식을 지원하고 장기간 배양물을 유지시키는데 필수적인 적절한 인자의 생산이 중단된다. 입구가 너무 크면, 기질세포는 입구를 가로질러 이어나갈 수 없게 된다. 이로써 기질세포가 증식을 지원하고 장기간 배양물을 유지시키는데 필수적인 적절한 인자를 적게 생산한다. 메쉬형태의 매트릭스를 이용하면, 150 $\mu$ m 내지 220 $\mu$ m 정도의 입구의 크기를 가지는 것이 만족스러운 결과를 가진다. 그러나, 3차원 구조와 구조물의 복잡성에 따라 다른 크기도 이용될 수 있다. 사실, 장기간동안 복제와 생장을 시킬 수 있도록 본 발명에서는 임의 구조와 모양이 이용될 수 있다.

구조에 침착된 상이한 비율로된 다양한 콜라겐은 상이한 조직-특이적인 세포를 구조에 접종하여 얻을 수 있다. 예를들면, 조혈 세포의 경우에, 매트릭스는 초기 매트릭스에서 콜라겐 III, IV, I 이 6:3:1의 비율로 포함된다. 피부의 경우에 콜라겐 I와 II이 초기 매트릭스에 침착된다. 침착된 콜라겐 형의 비율은 적절한 세포외 매트릭스 단백질을 만드는 섬유아세포를 선택함으로써 조절되거나 강화될 수 있다. 이는 상보 활성을 가지는 적절한 이소타입 또는 아류의 단백론 항체를 이용하여 얻을 수 있다. 상보체와 복합된 이와같은 항체를 이용하여 바람직한 콜라겐 형을 발현시키는 섬유아세포를 음성적으로 선택할 수 있다. 또는 구조물에 접종하는데 이용되는 기질은 소요의 적절한 콜라겐 형태를 합성하는 세포 혼합물이 될 수 있다. 다섯 종류 콜라겐의 분포와 기원은 표 1에 나타내었다.

[표 1]

다섯종류의 콜라겐 형태의 분포와 기원

콜라겐	원칙적으로 조직 분포	세포기원
I	연결조직; 콜라겐 섬유 섬유 연결 뼈 덴틴	망상세포; 연근세포  조골세포 조치세포
II	히알린과 탄성 연결 안구의 초자체	연골세포 망막세포
III	느슨한 연결조직; 망상섬유 피부의 유두층 혈관	섬유아세포와 망상세포  연근세포; 내피세포
IV	기저막 눈의 렌즈	상피와 내피세포 렌즈 섬유
V	태아막 : 태반 기저막 뼈 연근	섬유아세포   연근세포

본 발명의 배양물을 만드는 3차원 세포외 매트릭스는 생체에서 유전자 생성물을 도입하는 운반체를 만든



다. 특정 상황하에서, 외부 유전자 생성물, 성장인자, 조절인자를 포함하는 세포와 매트릭스를 만드는 것이 바람직하다. 이와같은 경우에 세포는 유전자 생성물 또는 기질세포에 의해 잘려있는 세포와 매트릭스에 고정된 유전자 생성물의 변형된 형을 발현시키기 위해 유전공학적으로 조작된다. 예를들어, 재조합 DNA 기술을 이용하여, 적절한 유도성 프로모터의 제어하에 소용의 유전자를 위치시킨다. 유전자를 포함하는 재조합 DNA 구조를 이용하여 3차원 배양 시스템에서 클론되고 연장될 숙주세포를 형질 변환시킨다. 이에 대해서 3차원 배양물을 이용하면 몇가지 장점을 가진다. 우선, 배양물은 진행 생물 세포로 구성되기 때문에, 유전자 생성물은 활성 생성물을 만들기 위해 배양물에서 적절히 발현되고 프로세스된다. 둘째, 다수의 형질 감염된 세포는 임상적인 가치, 관련성 용도등이 실제 보장된 것이다. 본 발명의 3차원 배양물은 다수의 형질 감염된 세포의 확장과 감염된 세포의 증식(세포분열을 통한)을 허용한다.

적절하게는 이용된 발현 제어요소는 유전자의 조절된 발현을 허용하고 따라서 생성물은 배양물에서 과다 합성된다. 선택된 전사 프로모터 일반적으로 프로모터 원소는 배양된 세포와 조직 형태에 따라 달라진다. 단백질을 분비할 수 있는(망상 내피와 골지체에 의해 특징이 지어진)세포와 조직이 적절하다.

3차 배양물의 배양 동안에, 증식 세포는 구조물에서 방출된다. 방출된 세포는 배양물 용기의 벽에 부착되고 이는 증식을 지속하여 합류 단층을 이룬다. 공급동안에 방출된 세포를 제거하거나 또는 새로운 반응용기에 3차원 배양물을 이동시켜 이를 최소화한다. 반응용기에 합류 단층의 존재는 3차원 구조 또는 배양물에서 세포의 성장을 중단시킨다 새로운 용기에 있는 새로운 배지로 기질 배양물을 이동시키거나 또는 합류 단층을 제거하여 3차원 배양시스템의 증식활성을 복원시킨다. 이와같은 제거 또는 이동은 25% 합류를 초과한 기질 단층을 가지는 임의 배양 용기에서 실시될 수 있다. 또는, 배양시스템을 교반하여 방출된 세포가 달라붙는 것을 막고 또는 주기적인 배양물의 공급 대신에 배양 시스템은 시스템을 통하여 새로운 배지를 지속적으로 흐르게 만들 수 있다. 유속은 3차원 배양물내에서 증식을 최대로 하고, 매트릭스에서 방출된 세포를 씻어내어 용기의 벽에 세포가 흡착되어 합류되지 않도록 조정한다. 임의 경우에, 방출된 기질세포를 수득하여 추가사용을 위해 냉동보관한다.

일단 3차원 배양구조에 접종한 후에, 섬유아세포의 흡착이 신속히 이루어지고(1시간내에), 섬유아세포는 몇일 이내에 구조의 입구를 가로질러 뚫어나가기 시작한다. 이와같은 섬유아세포는 대사적으로 활성이 있고 활성 섬유아세포와 콜라겐으로 구성된 피부에서 신속하게 세포와 매트릭스를 분비한다.

도 1 에서는 자연 분비되는 콜라겐 묶음 사이에 나란하게 층으로 섬유아세포를 배열하는 능력을 설명한다. 이와같은 섬유아세포는 신속하게 세포분열과 단백질을 분비한다.

## 5.2. 구조물에서 세포와 매트릭스의 제거

세포를 구조물에 접종시키고 세포성장에 맞는 조건에서 배양시킨후에 적절한 양의 세포와 매트릭스는 3차원 구조물에 분비되고 세포는 죽게되고 자연 분비된 세포와 매트릭스는 추가 처리된다.

이는 우선 세포를 죽이고, 죽은 세포를 제거하고, 3차원 구조물에서 임의 세포 찌꺼기를 제거하는 것에 관련이 있다. 이와같은 공정은 여러 가지 과정으로 실행된다. 예로써, 세포는 냉동보존제없이 액체 질소하에서 시험관에서 준비한 살아있는 기질 조직을 순간적으로 냉동시켜 죽인다. 세포를 죽이는 또다른 방법으로는 멸균수로 접종된 3차 구조물을 관주시키고 세포는 삼투압에 의해 터지게 된다. 일단 세포가 죽으며 EDTA, CHAPS 또는 양쪽성 계면 활성제와 같은 약한 계면활성제로 씻어내고 DMSO, 프로필렌 글리콜, 부탄에디올, 라피노즈, 폴리비닐 피롤리돈, 덱스트란 또는 슈크로즈와 같은 냉동 보호제로 처리하고 액체 질소에서 유리질로 만들어 세포막을 파괴하고 세포 찌꺼기를 제거한다. 또는 구조물은 세포막을 파괴하고 세포 내용물을 제거할 수 있는 시약으로 추출하거나 또는 효소에 의해 처리한다. 계면활성제의 예로는 비-이온성 계면활성제(예들들면 TRITON X-100, 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올, (Rohm and Haas); BRIJ-35, 폴리에톡시에탄올 라우릴 에테르(Atlas Chemical Co.), 트윈 20, 폴리에톡시에탄올 솔비탄 모노라우레이트(Rohm and Haas), LUBROL-PX 또는 폴리에틸렌 라우릴 에테르(Rohm and Haas); 그리고 이온성 계면 활성제(소듐 도데실 설페이트, 분지쇄 또는 직쇄의 7 내지 22개 탄소원자를 포함하는 설포네이트된 알칼라렌)등을 포함한다. 효소 또한 이용될 수 있는데 여기에는 뉴클리아제(예들들면, 데옥시리보뉴클리아제와 리보뉴클리아제), 포스포리파제와 리파제를 포함한다. 약한 계면 활성제로 세척하는 이유는 항원성이 강한 막-결합된 단백질을 용해시키는 장점이 있다.

일단 세포를 죽이고, 세포 찌꺼기를 제거하고 나면, 자연적으로 분비되는 사람 세포와 매트릭스를 모우는 것은 삼차원 구조물이 생체 분해성 또는 생체 비-분해성 물질로 구성되었느냐에 따라 여러 가지 방식으로 이루어질 수 있다. 예들들면 구조물이 생체 비-분해성 물질로 구성된 경우에, 3차원 구조물을 초음파 분해하거나, 고압 워터 젯트를 하거나 기계적인 스크랩하거나 또는 계면활성제 또는 효소로 처리하여 구조물로부터 부착된 세포와 매트릭스를 제거하여 생체-비 분해성 서포트로 부터 세포와 매트릭스를 제거할 수 있다.

세포와 매트릭스가 생체 분해가능한 3차원 구조물에 침착되는 경우에, 세포를 죽이고 세포와 세포 찌꺼기를 제거한 후에, 구조물은 용액에서 분해하여 즉 구조물을 용해시켜 세포와 매트릭스를 자유롭게 하여 회수할 수 있다. 또한, 생체분해성 서포트가 세포와 매트릭스와 같은 주사될 수 있는 물질로 구성되는 경우에, 주사용 주사기로 전체 세포와 매트릭스 피복된 구조물을 처리할 수 있다. 또한, 세포와 매트릭스가 생체 분해성 서포트에 침착되는 경우에, 매트릭스는 생체비 분해성 서포트에 침착된 경우와 동일한 방법으로 제거될 수 있는데, 예들들면, 3차원 구조물을 초음파 분해하거나, 고압 워터 젯트를 하거나 기계적인 스크랩하거나 또는 계면활성제 또는 효소로 처리하여 구조물로부터 부착된 세포와 매트릭스를 제거하여 생체-비 분해성 서포트로 부터 세포와 매트릭스를 제거할 수 있다. 제거과정은 세포에 의해 생성된 자연적으로 분비되는 사람 세포와 매트릭스를 손상 또는 변형시키지 않도록 한다.

## 5.3. 주사용 조성물과 이의 용도

일단 자연적으로 분비된 세포와 매트릭스를 수단한 후에, 추가 처리한다. 세포와 매트릭스는 미세입자로 균질화시켜 외과용 바늘을 통과시킨다. 초음파 분쇄와 같은 균질화 기술을 이용할 수 있다. 또한 세포와 매트릭스는 글루타알데히드와 같은 독성이 있는 화학적 교차 결합제를 이용하지 않고 감마 방사에 의해 교차 결합될 수 있다. 감마 방사는 물질을 살균시키기 위해서는 최소 20M rad 가 되어야 하는데, 그

이유는 모든 박테리아, 곰팡이 및 바이러스가 0.2M rads 에서 파괴되기 때문이다. 적절하게는 세포외 매트릭스를 0.25 내지 2M rad 에서 조사시켜 세포외 매트릭스를 살균시키고 교차결합시킨다.

또한, 콜라겐과 다른 단백질의 양과 그 비율은 주사기내에 물질을 넣기 전에 다른 세포형태에 의해 분비되는 세포외 매트릭스를 혼합시킴으로써 조정할 수 있다. 예를들어, 단백질 약물과 같은 생물학적으로 활성 물질을 본 발명의 조성물에 결합시켜 조성물의 주사후에 이와같은 활성물질의 방출 또는 방출제어를 할 수 있다. 생물학적으로 활성을 가진 물질에는 TGF- $\beta$  와 같은 조직 성장인자를 포함하고 주사부위에서 치유와 조직복구를 촉진시키는 물질이 포함된다.

자연적으로 분되는 사람 세포의 매트릭스 수용액은 현탁액의 이온강도를 등장성(약 0.1~0.2)으로 조정하고, 생리적 Ph(Ph6.8~7.5)로 조정하고, 주사시에 국소 통증을 감소시키기 위해 리도카인(일반적으로 0.3wt%)과 같은 국소마취제를 첨가하여 최종 조성물로 만든다. 최종 조성물에는 말토스와 같은 신체에 내성이 있는 유동성 윤활제를 포함한다. 윤활제 성분으로는 글리세롤, 글리코겐, 말토오스 등이 포함된다. 폴리에틸렌 글리콜과 히알루론산과 같은 유기 고분자 물질 및 숙시닐화된 콜라겐과 같은 비-원형 콜라겐이 윤활제로 작용할 수 있다. 이와같은 일반적인 윤활제를 이용하면, 주사부위에서 주사능, 밀어넣는 성질 및 주사된 물질의 분산성을 개선시키고, 조성물의 점성도를 조정하여 찌르는 양을 줄일 수 있다. 이와같은 최종 조성물은 제약학적 수용가능한 운반체에 처리된 세포외 매트릭스로 정의된다.

매트릭스는 결합이 있는 조직부위에 매트릭스를 정확하게 배치시키기 위해 주사기 또는 다른 주사기구에 넣는다. 피부 증식을 위한 조성물의 경우에, 주사용이란 실질적인 스파이킹없이 정상적인 조건에서 가능한 25가우지를 가지는 주사기를 분배될 수 있는 조성물을 의미한다. 스파이킹은 조직에 주사되기 보다는 주사기 밖으로 조성물이 스며나오게 된다. 정확한 위치를 잡기 위해, 27가우지(200 $\mu$  I.D) 또는 300 가우지(150 $\mu$  I.D)의 미세바늘이 바람직하다. 이와같은 바늘을 통하여 압출될 수 있는 최대 입자 크기는 적어도 다음과 같은 복합 기능을 가지는데; 입자 최대 크기, 입자 비율(길이: 폭), 입자 견고성, 입자의 표면 거칠기, 입자: 입자 흡착에 영향을 줄 수 있는 관련 인자, 현탁액의 점탄성 성질 및 바늘을 통하여 유속. 뉴톤성 액체에 현탁된 견고한 구형 비드가 가장 간단한 경우이고, 점탄성 유체에 섬유 또는 분지성 입자가 다소 복잡한 경우이다.

주사용 자연적으로 분비된 사람 세포외 매트릭스를 준비하는데 있어서 전술한 단계는 멸균물질을 이용하여 멸균조건하에서 적절히 실행한다. 제약학적 수용가능한 담체에 처리된 세포외 매트릭스는 연조직을 증가시키고, 선천성 이상 또는 후천성 이상 및 미용상의 결점을 복구하거나 교정하기 위해, 피부내 또는 피하로 주사된다. 이와같은 이상에는 반면 외소체형, 뺨과 협골성 형성부진증, 한쪽 유방 형성부진증, 누두홍, 가슴 발육 부진(Poland 이상), 분열된 구개 복구 또는 부정맥 분열 구개(인후염 이식물로써)에 2 차적인 인두 인컴피턴스와 같은 선천적인 이상; 눌려진 반흔, 피하 위축(원판상 흉반성 낭창), 각질성 병소, 안구함몰(상위 구 증후군), 안면의 좌창, 피하 위축성과 선형 공피증, 안장 코변성, Romberg 질환과 한쪽성대 마비와 같은 후천성 결함(수술에 의한, 외상에 의한, 감염에 의한); 찌푸린 미간, 깊은 비순 주름, 입주위 주름, 함몰된 뺨과 유방 발육부진과 같은 미용상의 단점등이 될 수 있다. 본 발명의 조성물은 이와같은 조직의 증식을 위해 신체 팔각근이 되는 내부 조직에 주사될 수 있다.

본 발명의 다양한 구체예가 하기 단락에서 설명된다. 이는 단순히 설명을 위함이며 이에 한정하고자 하는 의도는 아니며, 본 발명의 3차원 배양 시스템은 다양한 시스템에서 이용된 조직과 세포형태에 기초하여 상술하고 있다. 이와같은 설명에는 골수, 피부, 상피세포, 연골을 특별하게 포함하나 3차원 배양 시스템에는 다른 형태의 세포와 조직이 이용될 수 있다. 본 발명은 실시예를 통하여 설명하고 설명된 각 시스템에서 나온 특징적인 데이터를 설명한다.

## 실시예

### 6. 실시예 : 3차원 피부 기질 배양 시스템.

하기 부단락에서는 시험관에 상이한 기질세포를 배양하기 위한 본 발명의 3차원 배양시스템에 대해 상술하고 있다. 간략하면, 섬유아세포 배양물은 미리 멸균시킨 나일론 메쉬에서 만들었다. 배양 6~9일내에 흡착성 섬유아세포는 메쉬형 입구쪽으로 성장하여 콜라겐 덩어리를 침착시킨다. 단클론 항체를 이용한 간접적인 면역형광에서는 주로 콜라겐 I과 일부 콜라겐 III을 볼 수 있다.

#### 6.1. 피부 섬유아세포의 3차원 기질의 정립.

피부조직을 절단하고, 2시간동안 트립신 처리하고, 물리적인 수단에 의해 현탁액에 세포를 분리시켜 피부 섬유아세포를 분리해낸다. 섬유아세포는 25cm<sup>2</sup> 팔콘 조직 배양 접시에서 생장시켜 합류시키고 10% 태아 소혈청(FBS), 퓨지존, 젠타마이신과 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640(Sigma, MO)를 공급한다. 섬유아세포는 약한 트립신 처리에 의해 제거하고, 세포는 나일론 여과 메쉬에 플레이트시키고, 메쉬 섬유는 직경이 약 90 $\mu$ m이고 이를 210 $\mu$ m 메쉬입구를 가지도록 사각으로 직조한다(Tetko, Inc. NY). 메쉬는 약산으로 세척하고 폴리에탄올과 FBS로 배양시킨다. 섬유아세포의 흡착은 3시간 이내에 볼 수 있고 섬유아세포는 접종후 5-7일내에 메쉬 입구를 가로질러 뻗어나가기 시작한다. 이와같은 섬유아세포는 대사적으로 활성이 있고 세포외 매트릭스를 분비하고 활성이 있는 섬유아세포와 콜라겐으로 구성된 피부를 신속하게 만든다. 도 1 에서는 섬유아세포의 부착과 메쉬 입구를 가로질러 세포 프로세스의 확장을 나타내는 스캐닝 전자 현미경 사진이다.

#### 6.2. 3차원 골수 기질 배양물의 생성

조혈상으로 정상인 성인 지원자의 후부 장골능의 여러부위에서 골수를 뽑아낸다. 견본을 헤파린 처리한 튜브에 모우고, 10% FBS 와 5-10% HS 로 조건화한 8ml RPMI 1640 배지에 재현탁시키고 하이드로콘티솔, 퓨지존, 스트렙토마이신을 보충한다. 세포 덩어리를 분리시키고 5 $\times 10^6$  핵이 있는 세포 방울로 나눈다.

하기 실시예에서 상술하는 모든 기질 세포 배양물을 서포트하기 위해 3차 구조물로써 나일론 필터 스크린(#3-210/36, Tetko Inc. NY)을 이용하였다. 스크린은 직경이 90 $\mu$ m인 섬유로 구성되고 체의 구멍이 210 $\mu$ m인 사각으로 직조된 모양으로 합체된다. 기질세포는 6.1에서 설명하는 프로토콜에 따라 접종하였다. 역



상 대비 현미경과 스캐닝 전자 현미경(SEM)을 이용하여 기질 원소의 정착과 연속적인 성장을 모니터 할 수 있다.

### 6.3. 3차원 경구 점막 상피기질 매트릭스의 준비

경구 점막 조직 샘플은 교정 치과용 외과적 견본으로 부터 수득할 수 있다. 조직은 항생제(GIBCO, Cat. #600-5240 AG 의 항생제 항진균성 용액 2mℓ과 GIBCO Cat. #600-5710 AD/100cc MEM의 젠타마이신 용액 0.01mℓ)를 포함하는 새로운 MEM으로 3회 세척하고, 작도 조각으로 절단하고, 0.02% EDTA(W/V)로 세척한다. 0.25% 트립신 ( $\text{Ca}^{++}$  또는  $\text{Mg}^{++}$  없는 PBS에서)을 추가하고; 소초후에 조직작은 제거하고 새로운 트립신 ( $\text{Ca}^{++}$  또는  $\text{Mg}^{++}$  없는 PBS에서)에 두고 4℃에서 냉장한다. 조직을 제거하고 새로운 트립신 용액에 두고 세포가 단일-세포 현탁액의 형성할 때까지 부드럽게 교반시킨다. 단일-세포 현탁액은 10% 열처리된 비활성 태아 소혈청을 포함하는 MEM으로 희석하고 7분간 1400 × g 에서 원심분리시킨다. 상청액은 버리고, 저막 상피 세포를 포함하는 펠렛은 점종배지에 위치시킨다. 배지는 2% Utrosen G, 1 × L-글루타민, 1 × 비-필수 아미노산, 페니실린과 스트렙토마이신을 가지는 DMEM 으로 구성된다. 세포는 3차원 구조물에 점종시킨다. 3차원 기질 배양물은 경구 섬유아세포와 8mm × 45mm 나일론 여과스크린(#3-210/36, Tetko Inc. NY)을 이용하여 만든다. 메쉬는 약 30분간 0.1M 아세트산에 담구고 1시간동안 10mM 폴리리신 현탁액으로 처리한다. 메쉬는 멸균 배양 접시에 두고 DMEM 완전배지에서 전술한 것과 같이 1 × 10<sup>6</sup> 경구 섬유아세포로 점종시킨다. 5% CO<sub>2</sub> 에서 1~2시간 점종후에 메쉬는 Corning 25cm<sup>2</sup> 조직 배양 플라스크에 두고 추가 5mℓ배지로 부유시키고 혼합류시키고 3일 간격으로 공급한다. 배양물은 가슴대기에서 5% CO<sub>2</sub>와 37℃에서 DMEM 완전 배지에서 유지시키고 매 3일마다 새로운 배지를 공급한다.

### 6.4. 3차원 작은 혈관 내피세포 기질 세포 배양물의 준비.

Larson et al., 1987, Microvasc. Res. 34:184 의 방법에 따라 뇌에서 작은 혈관 내피세포를 분리하여 T-75 조직 배양 플라스크를 이용하여 시험관에서 배양한다. 세포는 Dulbecco's 수정된 Eagle 배지/Hans-F-12 배지 복합물(용액은 1:1 혼합물로 이용한다)에 유지시킨다. 배지에는 20% 열 변성된 태아 송아지 혈청(FCS), 글루타민, 항생제를 보충시킨다. 세포는 플라스크당 1 × 10<sup>6</sup> 세포 농도로 점종시키고, 1주일내에 합류상태에 도달한다. 세포는 1주일내 한 번씩 계대하고, 또한 FCS, 글루타민과 전술한 항생제를 포함하는 DMEM/Hans-F-12를 1주일내 한 번씩 공급한다. 세포를 계대하기 위해 플라스크는 5mℓ PBS ( $\text{Ca}^{++}$  또는  $\text{Mg}^{++}$  없이)로 2회 씻어내고, 0.53mM EDTA 와 0.05% 트립신 3mℓ로 트립신 처리한다. 세포는 펠렛화시키고, 재현탁시켜 트립신 블루 배지에 의해 생존성을 테스트하고, 점종시키고, 상기 DMEM/Hans-F-12 보충된 배지 25mℓ을 공급한다. 인자 VIII 관련 항원 검사(Grulnick et al. 1977, Ann. Int. Med. 86:598-616)를 이용하여 내피세포를 양성적으로 확인하고, 실버 착색을 이용하여 작은 혈관에 특이적인 견고하게 결합된 복합체를 확인한다.

전술한 것과같이 나일론 여과 스크린 메쉬(#3-210/36, Tetko, Inc., NY)를 준비한다. 메쉬는 30분간 아세트산 용액(1mℓ빙초산 + 99mℓ 증류수)에 담구고 다량의 증류수로 씻어내고 증기 멸균 시킨다. 메쉬는 8 × 8mm 메쉬당 6mℓ 태아 소혈청으로 피복시키고 하룻밤동안 배양한다. 메쉬는 3개 높이로 쌓아서 3 × 10<sup>7</sup> 작은 혈관 내피세포(전술한 것과 같이 배양된)를 이에 점종하고 가슴된 대기하에서 5% CO<sub>2</sub> 하에 37℃에서 3시간 배양시킨다. 점종된 메쉬는 완전한 합류가 이루어질때까지 (약 2주) 매 3~4일마다 DMEM/Hans-F-12 배지 10mℓ을 공급한다.

사람 뼈의 관절 표면에서 연골을 수득한다. 연골조직은 37℃에서 20분간 완전배지(10% 태아 소혈청, 글루타민, 비-필수 아미노산, 피루베이트 나트륨, 50μg/ml 아스코르베이트와 35μg/ml 젠타마이신)에서 콜라게네이즈(0.2% W/V)으로 처리한다. 유리된 연골세포는 회전시키고, 완전배지에서 재현탁시키고, 헤아리고 T-150 플라스크당 1 × 10<sup>6</sup> 세포 농도로 플레이트시킨다. 세포는 합류시에(매5-7일) 지속적으로 계대시킨다.

폴리글리콜산 메쉬(1mm 직경 × 2mm 두께)를 산화에틸렌 또는 전자광 처리에 의해 멸균시키고 완전배지에서 12시간동안 미리 담구어 둔다. 메쉬에는 총 10mℓ용적에 메쉬당 3-4 × 10<sup>6</sup> 세포로 6월 플레이트에 점종시키고 조직 배양기에서 37℃에서 3-4 시간동안 배양시킨다. 이때 1.5mℓ 배지를 첨가한다. 점종된 메쉬는 하룻밤동안 배양시킨다. 그 다음날 5mℓ 배지를 첨가한다. 배지는 합류가 이루어질때까지 1주일당 3회 교환한다.

## 7. 실시예: 세포와 매트릭스 조성물

적어도 2개 매트릭스 단백질의 내용물을 결정하기 위해 다수의 분석방법에 의해 세포와 매트릭스를 특징화시킨다. 각 값은 적어도 2개의 값의 평균이 된다. 매트릭스에는 콜라겐 I, III, 피브로넥틴, 테나신, 설페이트화된 글리코 사미노글리칸, 데코린과 다양한 여러 분비된 사람 세포와 매트릭스 단백질을 포함한다. 또한, 분비된 매트릭스 단백질은 3차원 서포트 매트릭스를 통하여 볼 수 있다. 세포와 매트릭스에는 총단백질을 292mg/cm<sup>2</sup> ± 0.06 총단백질을 포함하는데; 피브로넥틴은 3.4mg/cm<sup>2</sup> ± 1.2 가 있고 테나신은 1.7mg/cm<sup>2</sup> ± 0.60이 있다. 피브로넥틴과 테나신은 면역블랏에서 예상된 분자량 분포를 나타낸다.

### 7.1. 세포와 매트릭스의 콜라겐 함량

Sirius Red 검사를 이용하여 세포와 매트릭스의 콜라겐 함량을 측정하였다. 포화된 피크린산 용액에서 Sirius Red F3BA 의 결합을 이용하여 섬유성 콜라겐 침착을 평가한다(Bedossa et al., 1989, Digestion 44(1):7-13; Finkelstein et al., 1990, Br. J. Ophthalmol. 74(5): 280-282; James et al., 1990, Liver 10(1):1-5). 콜라겐에 Sirius Red 결합의 특이성은 조직적인 착색으로써 이의용도에 기초한다. 담즙분비정지 섬유증 정도가 다양한 쥐의 간에서, Sirius Red 결합에 의해 측정된 콜라겐 함량은 하이드록시프로린 내용물과 강한 상관관계를 보인다(Walsh et al., 1992, Analyt. Biochem. 203:187-190). Sirius Red 로 조직적인 착색을 하면 복굴절이 되는데 이는 콜라겐 가닥의 방향과 연관된 방향성 결합을 나타낸

다. Sirius Red 는 상보성분 C1 와 같은 콜라겐형 삼중 나선을 포함하는 전통적인 콜라겐 이외의 다른 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있다. 혈청 알부민에 일부 최소 결합이 나타났는데, 소혈청 알부민 표준을 이용한 기준 실험에서는 검사에서 간섭이 없는 것으로 나타났다. 간섭은 세포의 매트릭스에서 콜라겐 시그날의 2% 미만이 나타났고 Sirius Red 검사를 이용하면 콜라겐을 측정하는 반복성 검사를 할 수 있다. 세포와 매트릭스에는  $0.61\text{mg}/\text{cm}^2 \pm 0.09$  의 콜라겐을 포함한다. 또한 콜라겐 I와 III은 이유노 블랏에서 예상된 분자량 분포를 나타내었다.

## 7.2. 전자 현미경을 통해 콜라겐 섬유를 볼 수 있다.

시험관에서 생장한 피부조직에서 유도된 콜라겐과 정상성인 피부 샘플에서 유도된 콜라겐을 처리하여 전자 현미경(TEM)에 의해 볼 수 있다. 간략하면, 각 콜라겐을 무게를 달고, 30ml 0.05M 트리스 완충액(pH8.0)이 든 멸균 500ml 원심분리 튜브에 넣는다. wrist 교반기에서 2시간 혼합후에, 트리스 완충액을 제거하고 30ml 신선한 0.05M 트리스 완충액과 함께 균질화 실린더에 넣어둔다. 샘플은 완충액 단독으로 30초간 균질화시키고, 미국특허 4,969,912 와 5,332,802 에서 상술하고 있는 것과 같이 분열제를 추가하여 2회 30초 동안 파열시킨다. 기계적인 파열과정동안에온도는 5-10℃에서 유지시킨다. 분산제를 0.05%(콜라겐 습중량)농도에서 추가시킨다. 균질화된 준비물은 아직 분산안된 물질로 부터 분산된 콜라겐성 물질을 분리하기 위해 6분간 3500rpm 에서 원심분리시킨다. 분산안된 잔유물은 분산제 0.05%(콜라겐의 습중량기준) 농도에서 다시 처리하고 2회 30초간 파열시키기 위해 균질화시킨다. 분산물은 다시 원심분리시켜 제 1 회수물에 추가된 분산물 콜라겐 물질로 회수한다.

콜라겐성 분산물은 100 마이크론 필터를 통하여 여과시키고, 3500rpm 에서 원심분리시키고, 펠렛은 0.004M 인산 완충액, pH7.4 로 3회 세척한다. 최종 원심분리는 10,000 rpm 에서 실시하고, 콜라겐성 펠렛을 모은다. 샘플은 TEM을 위해 수집한다. 도 2A-D에서 나타난 것과같이, 시험관에서 생장시킨 피부조직에서 준비된(도 2A-B) 도는 정상 성인 사람 피부(도 2C-D)에서 준비된 세포와 매트릭스로 부터 분리된 콜라겐 섬유는 일반적인 콜라겐 결합을 가지는 그리고 정상적인 주기성을 가지는 고유 콜라겐 섬유와 동일한 것으로 보인다.

## 7.3. 세포와 매트릭스에 있는 글리코사미노글리칸

글리코사미노글리칸은 신체에서 다양한 구조적 그리고 기능적 역할에 중요하고 분비된 세포와 매트릭스에 이들의 존재가 중요하다. 표 2 에는 세포와 매트릭스에서 발견될 수 있는 글리코사미노글리칸의 예와 정상적인 피부에서 이들의 기능적인 중요성에 대해 나열하였다.

[표 2]

이름	위치	글리칸	기능	메카니즘
베르시칸	매트릭스	12-15 콘드로이틴 설페이트	구조	히알루론산과 콜라겐에 결합
데코린	매트릭스	1 콘드로이틴 데마탄 설페이트	TGF-β 와 다른 성장 인자에 결합; 콜라겐 에 결합	성장인자를 비활성화시킴
베타글리산	세포막	1-4 콘드로이틴/ 헤파린설페이트	TGF-β Type III 수용체	TGF β 의 부속수용체
신데칸	세포막	1-3 콘드로이틴 설페이트, 1-2 헤파린 설페이트	성장인자 결합	

또한, 세포와 매트릭스에는 총  $2.8\text{mg}/\text{cm}^2 \pm 0.1$  설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함한다는 것을 알았다.

## 7.4. 세포와 매트릭스에 있는 성장인자

세포와 매트릭스를 만들고 침착시키는 세포는 여러 가지 다양한 성장인자를 발현시킨다. 성장인자는 두 가지 이유로 세포와 매트릭스에 중요하다. 세포와 매트릭스의 성장과 침착동안에 자연적으로 접종된 성장인자는 세포 증식과 활성을 제어하는데 도움이 된다. 또한 성장인자는 세포와 매트릭스에 부착된 상태로 유지된다. 다양한 성장인자는 매트릭스에 침착되는 동안에 발현되는 것으로 밝혀졌다.

성장인자의 발현은 tRNA 의 역 전사체의 중합효소 사슬반응 CRT-PCR 에 의해 검사한다. 간략하면, RNA 는 SDS 침전과 유기 용매 분할 과정에 의해 성장세포로 부터 추출하였다. RNA 는 슈퍼스크립트 역전사 효소와 무작위 헥사머 프라이머를 이용하여 전사되었다. 역전사체의 동일 배치를 이용하여 모든 성장인자를 감지할 수 있다. 총용적 20ml에서 200mg RNA 에 상응하는 4μl 역전사체를 이용함으로써 표준저건하에서 PCR을 실행한다.

이 검사에 기초하여, 산성 및 염기성 FGF, TGF-α 와 TGF-β, KGF mRNA 전사체가 있고 표 3 에 나타난 여러 가지 다른 것들이 있는데 여기에는 PDGF, 암피레굴린, HBEGF, IGF, SPARC 와 VEGF 를 포함한다. 이중 DGF 와 TGF-β3 은 세포 증식과 배양물에서 매트릭스 침착에 관련되며, TGF-β1, HBEGF, KGF, SPARC, VEGF 와 데코린은 매트릭스에서 침착되었다. 이 실험에서 이용된 감응도에서 암피레굴린, IGF-1, IGF-2 와 IL-1 이 발현되지 않았다.

[표 3a]

mRNA	완전한 이름	기능	발현
PDGF0-A 사슬	혈소판 유도된 성장 인자 A 사슬	섬유아세포의 미토겐, 조직 과립형성, 화학주성	++
PDGF-B 사슬	혈소판 유도된 성장 인자 B 사슬	섬유아세포의 미토겐, 조직 과립형성, 화학주성	0-(+)*
IGF-1	인슐린과 유사한 성장인자-1	섬유아세포용 미토겐	0
IGF-2	인슐린과 유사한 성장인자-2	섬유아세포용 미토겐	(+)
TGF- $\alpha$	형질전환 성장인자 $\alpha$	섬유아세포용 미토겐, 케라틴 세포용 미토겐	+
암피레굴린	암피레굴린	섬유아세포용 미토겐, 케라틴 세포용 미토겐	0
KGF	케라틴세포 성장인자	케라틴세포용 미토겐	++
HBEGF	헤파린 결합 상피 성장 인자와 유사한 성장인자	섬유아세포용 미토겐, 케라틴세포용 미토겐	+++
TGF- $\beta$ 1	형질성장인자- $\beta$ 1	매트릭스 침착 자극	+
TGF- $\beta$ 3	형질성장인자- $\beta$ 3	매트릭스 침착 자극	++-++
VEGF	맥관 내피 성장인자	맥관형성 인자	++
SPARC	분비된 단백질 산성 및 시스테인이 풍부	복합 항-맥관형성, 맥관형성	++++
ICAM-1	세포간 흡착분자-1	임파세포 흡착, 이동성	+
VCAM	맥관세포 흡착 흡자	임파세포 흡착, 이동성	+++

[표 3b]

GAPDh	글리세르알데히드 3-포스포이트 디하드로게나제	글리코분해성 하우스키핑 유전자	+++
$\beta$ 2-마이크로 글로블린	$\beta$ 2-마이크로글로블린	항원제공	+++
* PDGF B 사슬 소량의 일부 조성물에 있는 것을 볼 수 있다.			

본 발명은 이들 구체예들이 본 발명의 여러 가지 특징을 설명하고자 하는 의도이기 때문에 특정 구체예에 본 발명을 한정시키고자 함이 아니다. 임의 등가의 구체예도 본 발명의 범위에 속한다. 또한 여기에서 상술한 것에 추가하여 본 발명의 다양한 변화 또한 본 기술분야에 속자된 자는 인지할 것이며 이 또한 본 발명의 범위에 속한다.

다수의 참고문헌을 언급하였으며, 이 내용은 여기에 포함된다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1

3차원 매트릭스에 피복된 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스를 만드는 방법에 있어서,

- 세포외 매트릭스가 집중된 구조물에 분비되어 구조물을 피복시킬 수 있을 정도의 충분한 예정 시간동안 세포 성장에 적합한 조건하에 3차 구조물위에서 세포를 배양시키고;
- 세포를 죽이고; 그리고
- 세포와 세포 찌꺼기를 제거하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 3차원 구조물은 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플로로에틸렌, 테르마녹스, 니트로셀룰로오즈, 면, 폴리글리콜산, 고양이 내장 봉합사, 셀룰로오즈, 젤라틴, 키토산, 히알루론산 및 덱스트란에서 선택된 물질로 만드는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서, 3차원 구조물은  $150\mu\text{m}$  내지  $220\mu\text{m}$  의 구멍을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서, 조직 특정 세포에 의해 세포외 매트릭스가 분비되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제 1 항에 있어서, 세포외 매트릭스는 섬유아세포, 조골세포, 조치세포, 연골세포, 상피세포, 연근세포, 망막세포, 내피세포, 기질세포 또는 이의 복합물에서 선택된 세포에 의해 분비된 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스를 만드는 방법에 있어서,

- a) 세포외 매트릭스가 점종된 구조물에 분비되어 구조물을 피복시킬 수 있을 정도의 충분한 예정 시간동안 세포 성장에 적합한 조건하에 3차 구조물위에서 세포를 배양시키고;
- b) 세포를 죽이고; 그리고
- c) 세포와 세포 찌꺼기를 제거하고; 그리고
- d) 피복된 구조물에 침착된 세포외 매트릭스를 수집하는 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제 6 항에 있어서, 3차원 구조물은 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플로로에틸렌, 테르마녹스, 니트로셀룰로오즈, 면, 폴리글리콜산, 고양이 내장 봉합사, 셀룰로오즈, 젤라틴, 키토산, 히알루론산 및 덱스트란에서 선택된 물질로 만드는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제 6 항에 있어서, 3차원 구조물은  $150\mu\text{m}$  내지  $220\mu\text{m}$  의 구멍을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제 6 항에 있어서, 조직 특정 세포에 의해 세포외 매트릭스가 분비되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제 6 항에 있어서, 세포외 매트릭스는 섬유아세포, 조골세포, 조치세포, 연골세포, 상피세포, 연근세포, 망막세포, 내피세포, 기질세포 또는 이의 복합물에서 선택된 세포에 의해 분비된 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

3차 구조물로 구성된 조성물에 있어서, 자연적으로 분비된 세포외 매트릭스로 피복된 구조물은 사람 단백질로 구성된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 12**

제 11 항에 있어서, 3차원 구조물은 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플로로에틸렌, 테르마녹스, 니트로셀룰로오즈, 면, 폴리글리콜산, 고양이 내장 봉합사, 셀룰로오즈, 젤라틴, 키토산, 히알루론산 및 덱스트란에서 선택된 물질로 만드는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 13**

제 11 항에 있어서, 3차원 구조물은  $150\mu\text{m}$  내지  $220\mu\text{m}$  의 구멍을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 14**

제 11 항에 있어서, 조직 특정 세포에 의해 세포외 매트릭스가 분비되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 15**

제 11 항에 있어서, 세포외 매트릭스는 섬유아세포, 조골세포, 조치세포, 연골세포, 상피세포, 연근세포, 망막세포, 내피세포, 기질세포 또는 이의 복합물에서 선택된 세포에 의해 분비된 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 16**

조직 결합의 치료를 위한 주사용 자연 분비되는 세포외 매트릭스 조성물에 있어서, 사람의 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스와 제약학적으로 수용가능한 운반체로 구성되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서, 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스를 만드는 방법에 있어서,

- a) 세포외 매트릭스가 접종된 구조물에 분비되어 구조물을 피복시킬 수 있을 정도의 충분한 예정 시간동안 세포 성장에 적합한 조건하에 3차 구조물위에서 세포를 배양시키고;
- b) 세포를 죽이고;
- c) 세포와 세포 찌꺼기를 제거하고
- d) 피복된 구조물에 침착된 자연적으로 분비된 세포외 매트릭스를 수득하고; 그리고
- e) 수득된 세포외 매트릭스는 제약학적 수용가능한 담체로 처리하는 것으로 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 18

제 17 항에 있어서, 상이한 조직 또는 세포형에 의해 분비되는 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스는 d)와 e)단계에서 혼합되고 각 콜라겐 I-V 의 비율은 서로 조정되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 19

제 16 항에 있어서, 3차원 구조물은 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플로로에틸렌, 테르마녹스, 니트로셀룰로오즈, 면, 폴리글리콜산, 고양이 내장 봉합사, 셀룰로오즈, 젤라틴, 키토산, 히알루론산 및 덱스트란에서 선택된 물질로 만드는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 20

제 16 항에 있어서, 3차원 구조물은  $150\mu\text{m}$  내지  $220\mu\text{m}$  의 구멍을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 21

제 16 항에 있어서, 조직 특정 세포에 의해 세포외 매트릭스가 분비되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 22

제 16 항에 있어서, 세포외 매트릭스는 섬유아세포, 조골세포, 조치세포, 연골세포, 상피세포, 연근세포, 망막세포, 내피세포, 기질세포 또는 이의 복합물에서 선택된 세포에 의해 분비된 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 23

조직 결함을 복구하는 방법에 있어서, 조직 결함부위에 제약학적 수용가능한 담체내에 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스 주사용 물질을 주사하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 24

제 23 항에 있어서, 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스를 만드는 방법에 있어서,

- a) 세포외 매트릭스가 접종된 구조물에 분비되어 구조물을 피복시킬 수 있을 정도의 충분한 예정 시간동안 세포 성장에 적합한 조건하에 3차 구조물위에서 세포를 배양시키고;
- b) 세포를 죽이고;
- c) 세포와 세포 찌꺼기를 제거하고
- d) 피복된 구조물에 침착된 자연적으로 분비된 세포외 매트릭스를 수득하고; 그리고
- e) 수득된 세포외 매트릭스는 제약학적 수용가능한 담체로 처리하는 것으로 단계로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 25

제 23 항에 있어서, 상이한 조직 또는 세포형에 의해 분비되는 자연적으로 분비되는 세포외 매트릭스는 d)와 e)단계에서 혼합되고 각 콜라겐 I-V 의 비율은 서로 조정되는 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 26

제 23 항에 있어서, 3차원 구조물은 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리비닐 화합물, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플로로에틸렌, 테르마녹스, 니트로셀룰로오즈, 면, 폴리글리콜산, 고양이 내장 봉합사, 셀룰로오즈, 젤라틴, 키토산, 히알루론산 및 덱스트란에서 선택된 물질로 만드는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 27

제 23 항에 있어서, 3차원 구조물은  $150\mu\text{m}$  내지  $220\mu\text{m}$  의 구멍을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 28

제 23 항에 있어서, 조직 특정 세포에 의해 세포외 매트릭스가 분비되는 것을 특징으로 하는 방법.

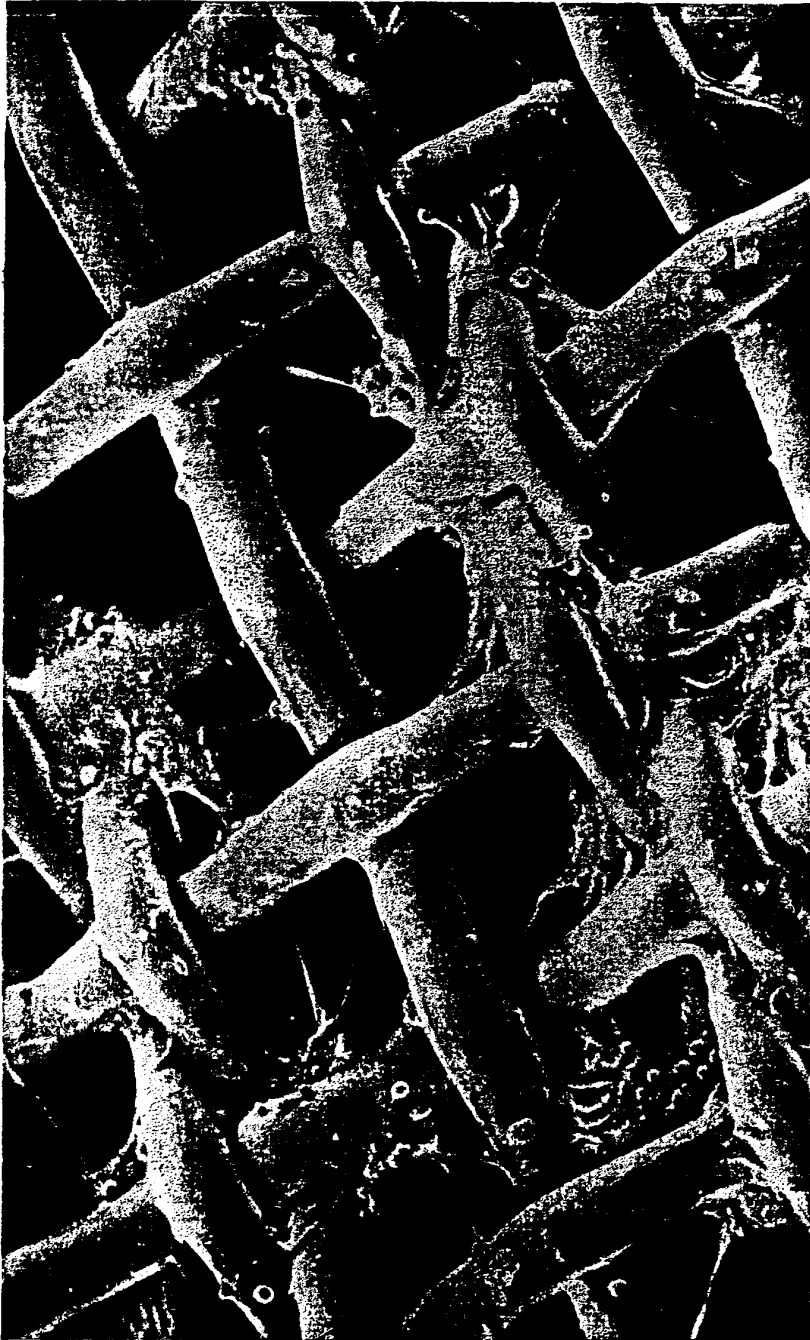
#### 청구항 29

제 23 항에 있어서, 세포외 매트릭스는 섬유아세포, 조골세포, 조치세포, 연골세포, 상피세포, 연근세포, 망막세포, 내피세포, 기질세포 또는 이의 복합물에서 선택된 세포에 의해 분비된 것을 특징으로 하는 방

면.

도면

도면1





도면2A



도면28



도면20



도면20

