



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0145954

(43) 공개일자 2014년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61F 2/24 (2006.01) A61M 39/22 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7031538

(22) 출원일자(국제) 2012년05월24일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2013년11월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/039450

(87) 국제공개번호 WO 2012/166554

국제공개일자 2012년12월06일

(30) 우선권주장

61/490,693 2011년05월27일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

코매트릭스 카디오바스큘라 인코포레이티드

미국, 조지아 30076, 로스웰, 올드 엘리스 로드 1100

(72) 발명자

매서니, 로버트, 지.

미국, 조지아 30092, 놀크로스, 리버 바톱 드라이브 4370

(74) 대리인

특허법인 정안

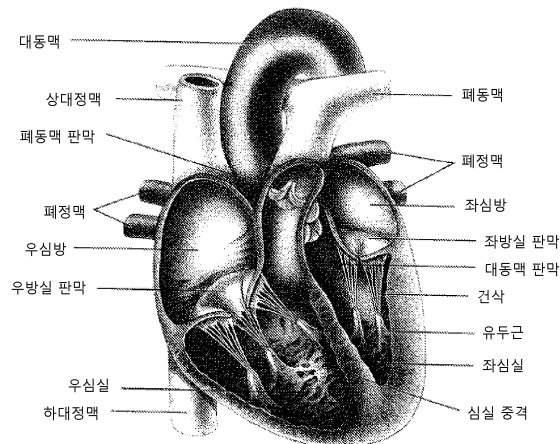
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 세포외 기질 물질 도관 및 이의 제조 및 사용 방법

(57) 요약

세포외 기질(ECM) 물질 도관이 개시되어 있다. 또한, ECM 물질 도관을 이용하여 개체의 심장 내의 결함있는 방실 판막을 대체하기 위해 방실 판막을 재생하는 방법이 개시되어 있다. 또한, ECM 물질을 멸균 및 탈세포화하는 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

61/490,873 2011년05월27일 미국(US)

61/491,723 2011년05월31일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

개체의 심장 내의 심방과 심실 사이의 판막륜 영역에 부착되어 있고 개체의 심장의 심실 내의 다수의 유두근에 결합되어 있는 결합있는 방실(AV) 판막을 대체하기 위해 AV 판막을 재생하는 방법으로서,

상기 개체의 심장으로부터 결합있는 AV 판막을 제거하고;

내강을 한정하고 입구 부분 및 출구 부분을 갖는 세포외 기질(ECM) 물질 도관을 이식하되, 상기 ECM 물질 도관의 입구 부분이 판막륜 영역에 고정되고 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분이 상기 다수의 유두근들 중 적어도 두 개의 유두근에 고정되도록 하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관은 적어도 한 종의 조직을 포함하고, 상기 적어도 한 종의 조직의 각각의 조직은 각각의 조직 소스로부터 얻어지고, 상기 적어도 한 종의 조직의 각각의 조직의 조직 소스는 소장 점막하층, 위 점막하층, 대장 조직, 비뇨 방광 점막하층, 간기저막, 심낭막, 외심막, 심장내막, 심근막, 폐조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수노관, 정맥, 동맥, 혈관이 부착되어 있거나 부착되지 않은 심장 판막, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관은 멸균되고 무세포성인, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 입부 부분 및 출구 부분은 각각 외측 주변을 갖고, 상기 출구 부분의 외측 주변은 크기가 입구 부분의 외측 주변과 실질적으로 동일한, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 입구 부분 및 출구 부분은 각각 외측 주변을 갖고, 상기 출구 부분의 외측 주변은 크기가 입구 부분의 외측 주변보다 큰, 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 입부 부분 및 출구 부분은 각각 외측 주변을 갖고, 상기 출구 부분의 외측 주변은 크기가 입구 부분의 외측 주변보다 작은, 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관을 이식하는 단계는 개체의 심장의 심실 내의 제 1 유두근 및 제 2 유두근에만 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분을 고정하는 것을 포함하고, 상기 ECM 물질 도관에 의해 재생된 대체 AV 판막이 이첨 판막인, 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 결합있는 AV 판막이 삼첨 판막인, 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 제 1 유두근이 상기 개체의 심장의 우심실의 전방 유두근이고, 상기 제 2 유두근이 상기 개체의 심장의 우심실의 후방 유두근인, 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 제 1 유두근이 상기 개체의 심장의 우심실의 전방 유두근이고, 상기 제 2 유두근이 상

기 개체의 심장의 우심실의 중격 유두근인, 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 제 1 유두근이 상기 개체의 심장의 우심실의 후방 유두근이고, 상기 제 2 유두근이 상기 개체의 심장의 우심실의 중격 유두근인, 방법.

청구항 12

제 7 항에 있어서, 상기 결합있는 AV 판막이 이첨(승모) 판막인, 방법.

청구항 13

제 7 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분은 외측 주변을 갖고, 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분에는 제 1 부착 지점에 제 1 유두근이 고정되어 있고 제 2 부착 지점에 제 2 유두근이 부착되어 있고, 상기 제 2 부착 지점은 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분의 외측 주변을 따라 제 1 부착 지점으로부터 이격되어 있는, 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관에 의해 한정된 내강은 ECM 물질 도관의 출구 부분에 근접한 중심점을 갖고, 상기 내강의 중심점은 상기 제 1 부착 지점과 제 2 부착 지점의 사이에 형성된 각도의 각정에 해당하는, 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 제 1 부착 지점과 제 2 부착 지점의 사이에 형성된 각도는 약 120° 내지 약 150° 의 범위의 크기를 갖는, 방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 상기 결합 있는 AV 판막은 삼첨 판막이고, 상기 ECM 물질 도관을 이식하는 단계는 상기 개체의 심장의 심실 내의 제 1 유두근, 제 2 유두근 및 제 3 유두근에 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분을 고정하는 것을 포함하고, 상기 ECM 물질 도관에 의해 재생된 대체 AV 판막은 삼첨 판막인, 방법.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관은 세로 길이, 제 1 말단 및 이에 대향한 제 2 말단을 갖고, 상기 방법은 상기 ECM 물질 도관을 이식하는 단계 전에, 상기 ECM 물질 도관의 제 2 말단을 향해 ECM 물질 도관의 세로 길이의 적어도 일 부분을 따라 ECM 물질 도관의 내강 내로 ECM 물질 도관의 제 1 말단을 내전시킴으로써 다층 ECM 물질 도관을 형성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 18

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관은 세로 길이, 제 1 말단 및 이에 대향한 제 2 말단을 갖고, 상기 방법은 상기 ECM 물질 도관을 이식하는 단계 전에, 상기 ECM 물질 도관의 제 2 말단을 향해 ECM 물질 도관의 세로 길이의 적어도 일 부분을 따라 ECM 물질 도관의 제 1 말단을 외전시킴으로써 다층 ECM 물질 도관을 형성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제 1 항에 있어서, 상기 개체의 심장으로부터 결합있는 AV 판막을 제거하는 단계는 상기 결합있는 AV 판막에 부착된 건삭의 적어도 일부분을 제거하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 20

제 1 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분은 다수의 연장 부분을 포함하고, 상기 적어도 두 개의 유두근의 각각의 유두근은 상기 다수의 연장 부분의 각각의 연장 부분에 고정되는, 방법.

청구항 21

개체의 심장 내의 심방과 심실 사이의 판막륜 영역에 부착되어 있고 개체의 심장의 심실 내의 다수의 유두근에 결합되어 있는 결합있는 방실(AV) 판막을 대체하기 위해 AV 판막을 재생하는 ECM 물질 도관으로서, 상기 ECM 물질 도관은 내강을 한정하고 입구 부분 및 출구 부분을 갖고, 상기 ECM 물질 도관의 입구 부분은 상기 개체의 심장의 판막륜 영역에 부착되도록 구성되고, 상기 ECM 물질 도관의 적어도 일부분은 다층 적층 구조를 갖고, 상기 ECM 물질 도관의 출구 부분은 다수의 연장 부분을 갖고, 상기 다수의 연장 부분의 각각의 연장 부분은 상기 적어도 두 개의 유두근의 각각의 유두근에 부착되도록 구성되는, ECM 물질 도관.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관이 멸균되고 무세포성인, ECM 물질 도관.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 입구 부분 및 출구 부분이 각각 외측 주변을 갖고, 상기 출구 부분의 외측 주변은 크기가 입구 부분의 외측 주변과 실질적으로 동일한, ECM 물질 도관.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 입구 부분 및 출구 부분이 각각 외측 주변을 갖고, 상기 출구 부분의 외측 주변은 크기가 입구 부분의 외측 주변보다 큰, ECM 물질 도관.

청구항 25

제 21 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 입구 부분 및 출구 부분이 각각 외측 주변을 갖고, 상기 출구 부분의 외측 주변은 크기가 입구 부분의 외측 주변보다 작은, ECM 물질 도관.

청구항 26

제 21 항에 있어서, 상기 다수의 연장 부분은 제 1 연장 부분 및 제 2 연장 부분을 포함하고, 상기 제 1 연장 부분 및 제 2 연장 부분은 각각의 연장 지점을 통해 ECM 물질 도관에 고정되어 있고, 상기 ECM 물질 도관에 의해 한정된 내강은 ECM 물질 도관의 출구 부분에 근접한 중심점을 갖고, 상기 내강의 중심점은 상기 제 1 및 제 2 연장 부분의 연장 지점들의 사이에 형성된 각도의 각정에 해당하는, ECM 물질 도관.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 제 2 연장 부분의 제 1 및 제 2 연장 지점들의 사이에 형성된 각도는 약 120° 내지 약 150° 의 크기를 갖는, ECM 물질 도관.

청구항 28

제 21 항에 있어서, 상기 ECM 물질 도관의 적어도 일부분이 다층 구조를 갖는, ECM 물질 도관.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 다층 구조가 다층 적층 구조를 포함하는, ECM 물질 도관.

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 상호참조

본 출원은 2011년 5월 27일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/490,693호, 2011년 5월 27일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/490,873호, 2011년 5월 31일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/491,723호, 및 2012년 5월 23일자 출원된 미국 가특허출원 제 61/650,911호의 출원일의 이익을 주장하며, 상기 미국 가특허출원들은 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

본 발명은 세포외 기질 물질 도관(extracellular matrix (ECM) material conduit) 및 이러한 ECM 물질을 이용

하여 개체의 심장 내의 방실 판막(atrioventricular (AV) valve)을 재생하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 많은 유형의 대체 심장 판막이 알려져 있다. 특정 유형의 대체 심장 판막의 선택은 판막의 위치, 환자의 연령 및 기타 특성, 및 외과의사의 경험 및 선호도와 같은 요소에 의존한다. 일반적으로 사용되는 대체 심장 판막은 하기의 세 그룹으로 분류될 수 있다: 기계적 판막; 동종 이식 조직 판막; 및 이종 이식 조직 판막.
- [0005] 예를 들어 제한 없이 새장속 공모양 판막(caged-ball valve), 이중 소엽식 판막(bi-leaflet valve) 및 경사 원반 판막(tilting disk valve)을 비롯한 기계적 심장 판막은 일반적으로 봉합 링(sewing ring)에 부착되어 수술 후 그 판막 보철물이 환자의 자연 조직에 통합되어 그 기계적 판막이 적소에서 유지될 수 있도록 한다. 기계적 심장 조직은 장기 내구성의 이점이 있지만, 이러한 기계적 판막은 환자 내에서 혈괴의 형성을 유발하려는 경향도 있다. 이러한 혈괴가 기계적 판막 상에 형성되는 경우, 이들 혈괴는 판막이 제대로 열리거나 닫히는 것을 방해할 수 있거나, 더욱 중요하게는 판막으로부터 풀리고 뇌로 이동하여, 색전성 뇌졸중을 유발할 수 있다. 따라서, 이러한 기계적 판막을 수용하는 환자는 일반적으로 이들의 나머지 삶 동안 전신성 항응고약을 복용하여야 한다. 값이 비싼 외에도, 이러한 항응고약은 환자 내에서 비정상적인 출혈을 유발하여 출혈성 뇌졸중을 유발할 수 있는 위험이 있을 수 있다.
- [0006] 동종이식 조직 판막은 인간의 시체와 같은 인간 소스로부터 얻어진다. 기계적 심장 판막과 다르게, 동종 이식 판막은 일반적으로 혈괴 형성을 촉진하지 않으므로, 환자에게 항응고약을 처방할 필요성을 제거한다. 그러나, 동종 이식 조직 판막은 새로운 심장 판막을 필요로 하는 모든 환자의 필요성을 만족시키기에는 충분한 수로 입수될 수 없다. 또한, 동종이식 조직 판막이 개체 내에서 방실(AV) 판막을 대체하기 위해 사용된 경우 유의한 합병증이 있어왔다. 또한, 동종이식 조직 판막은 기계적 판막이나 이종이식 판막과 비교하여 이식하기가 더욱 어려울 수 있다. 이러한 이식의 어려움 때문에, 동종이식 조직과 관련된 수술 위험성은 종종 기계적 판막 및 이종이식 판막과 관련된 수술 위험성보다 크다.
- [0007] 이종이식 조직 판막은 소나 돼지와 같은 비인간 조직 소스로부터 형성된다. 대부분의 알려진 이종이식 조직 판막은 비인간 조직 소스 유래의 판막 소엽을 봉합하고/하거나 제작한 다음, 그 소엽을 스텐트 및/또는 봉합 링을 이용하여 환자의 심장내에 고정함으로써 제작된다. 이러한 이종이식 조직 판막은 비교가능한 기계적 판막보다 혈괴 형성을 유발하는 가능성이 적기 때문에, 이종이식 조직 판막을 수용하는 환자가 항응고약을 항상 복용할 필요가 없다. 그러나, 이종이식 조직 판막은 석회화되기 쉽고 기계적 판막의 장기 내구성이 없기 때문에, 기계적인 판막과 비교하여 자주 교체할 필요가 있다. 이러한 고장의 원인이 될 수 있는 한 가지 요인은 이종이식 조직이 일반적으로 받은 화학적 처리로서, 이는 동물 조직의 항원성을 감소시킨다. 이러한 화학적 처리가 없는 경우, 이종 이식 조직 판막은 환자 내에서 면역 반응을 유발하여 환자가 조직 판막의 거부하게 할 수 있다. 이종이식 조직 판막의 내구성의 결여의 원인이 될 수 있는 또 다른 요인은 스텐트 및/또는 봉합 링의 존재로서, 이는 이종이식 조직 판막을 정상 심장 판막의 해부학적 구조에 정확히 접근시키는 것을 방해할 수 있다.
- [0008] 그 전체가 본원에 참조로 특별히 포함되는 미국특허 제 5,480,424 호 및 5,713,950호에 기재된 것들을 비롯한 알려진 조직 도관들은 알려진 이종이식 조직 판막의 한계를 비롯한 여러 가지 한계가 있다. 예를 들어, 알려진 조직 도관은 그 도관의 이식 후 내구성을 약화시키는 화학적 처리를 이용하여 일반적으로 처리되는 도관 항원성의 한계가 있다. 게다가, 이러한 알려진 도관은 환자의 심장 내에서 급속히 분해됨으로써 겨우 수 개월 동안만 충분한 심장 판막 대체물로 작용할 수 있다.
- [0009] 따라서, 개체의 심장 내에서 해부학적으로 정확한 AV 판막을 재생하도록 용이하게 이식될 수 있고, 쉽게 입수가 가능하고, 내구성이 높고 알맞은 조직 보철물이 당업계에서 요구된다. 또한, 개체의 심장 내에서 해부학적으로 정확한 AV 판막을 재생하도록 용이하게 이식될 수 있고, 멸균되고 무세포성인 조직 보철물이 당업계에서 요구된다.

발명의 내용

- [0010] 요약
- [0011] 세포외 기질(ECM) 물질 도관이 개시된다. 하나의 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관은 내강(lumen)을 한정하고 입구 부분 및 출구 부분을 갖는다. ECM 물질 도관의 입구 부분은 내강의 입구를 포함한다. ECM 물질 도관의 출구 부분은 내강의 출구를 포함한다. ECM 물질 도관의 입구 부분 및 출구 부분은 각각 외측 주변을 갖는다. ECM 물질 도관은 멸균되고 무세포성이다. 또한, 개체의 심장 내의 결함있는(defective) AV 판막을 대체하기 위

해 방실(AV) 판막을 재생하는 방법이 개시된다. 하나의 양상에서, 상기 방법은 개체의 심장으로부터 결합있는 AV 판막을 제거하는 것을 포함한다. 또한, 상기 방법은 기능성 AV 판막을 재생하기 위해 개체의 심장 내에 ECM 물질 도관을 이식하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 바람직한 실시예의 이러한 특징 및 다른 특징들은 첨부 도면을 참조한 하기의 상세한 설명에서 더욱 명백하게 된다.

도면에서,

도 1은 인간 심장의 부분 절개도(cut-away view)이다.

도 2는 본원에 개시된 바와 같이 방실 판막의 판막륜에 부착되고 두 개의 유두근에 부착되어 있는 ECM 물질 도관의 사시도이다.

도 3은 도 2에서 도시한 ECM 물질 도관의 하부 사시도이다. 도 3에서 도시한 ECM 물질 도관은 제 1 부착 지점을 통해 제 1 유두근에 부착되어 있고 제 2 부착 지점을 통해 제 2 유두 근육에 부착되어 있다.

도 4는 개체의 심장으로부터 제거한 후의 자연상태의 삼첨판막(tri-cuspid valve)의 이미지이다. 도 4는 여러 가지 자연상태의 폐지 및 인간 삼첨 판막에 대하여 수행된 특정 측정들에 해당하는 마킹(marking)을 포함한다.

도 5는 자연상태의 삼첨 판막의 제거 후 ECM 물질 도관의 이식 후의 ECM 물질 도관의 이미지이다. 도 5는 우심장의 시험관내 모델에서 폐쇄 상태의 ECM 물질 도관을 도시한다.

도 6은 동물 내에서 삼첨 판막으로 작용하는 예시적인 ECM 물질 도관에 대하여 수술 후에 촬영한 Doppler 심장 초음파 검사(echocardiography) 이미지이다. 도 6(a)은 폐쇄 상태의 판막으로 수술한 후 1개월째의 ECM 물질 도관을 도시한다. 도 6(b)은 개방 상태의 판막으로 수술한 후 즉시 상태의 ECM 물질 도관을 도시한다. 도 6(c)은 폐쇄 상태의 판막으로 수술한 후 즉시 상태의 ECM 물질 도관을 도시한다.

도 7은 본원에 개시한 바와 같은 예시적인 ECM 물질 도관의 이식 후 여러 시점에서의 재생된 삼첨 판막의 이미지를 도시한다. 도 7(a)은 3개월째의 재생을 도시한다. 도 7(b)은 5개월째의 재생을 도시한다. 도 7(c)은 8개월째의 재생을 도시한다. 도 7(d)은 12개월째의 재생을 도시한다.

도 8은 본원에 개시한 바와 같은 예시적인 ECM 물질 도관의 이식 후 3개월째의 재생된 삼첨 판막의 이미지를 도시한다.

도 9 및 도 10은 본원에 개시한 멸균 방법을 비롯한 여러 멸균 방법을 수행한 이후에 소장 점막하층(SIS) 조성물에 대하여 DNA 함량을 측정된 실험의 결과를 도시한다. 도 9는 멸균 후 각각의 SIS 조성물의 DNA 함량을 도시한다. 도 10은 멸균 후에 각각의 SIS 조성물로부터 제거된 DNA의 비율을 원료상태의 미처리 SIS와 비교하여 도시한다.

도 11 및 도 12는 본원에 개시한 멸균 방법을 비롯한 여러 멸균 방법을 수행한 후 소장 점막하층(SIS) 조성물에 대한 천연 성장 인자 함량을 측정된 실험의 결과를 도시한다. 도 11은 멸균 후 각각의 SIS 조성물의 bFGF 함량(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)을 도시한다. 도 12는 멸균 후 각각의 SIS 조성물의 활성 TGF- β 함량(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)을 도시한다.

도 13은 본원에 개시한 바와 같은 급속 감압 후 SIS 조성물 내로 bFGF를 혼입한 실험의 결과를 도시한다. 도 13은 급속 감압 후 각각의 SIS 조성물의 bFGF 함량(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)을 도시한다.

도 14는 본원에서 개시한 멸균 방법을 비롯한 여러 멸균 방법을 수행한 후 2겹(two-ply) SIS 조성물의 인장 강도를 측정된 실험의 결과를 도시한다. 도 14는 멸균 후 각각의 SIS 조성물에 대하여 측정된 인장 강도를 도시한다.

도 15는 본원에서 개시한 멸균 및 탈세포화 방법을 비롯한 여러 가지 멸균 및/또는 탈세포화 방법을 수행한 후 SIS 조성물에 대한 천연 성장 인자 함량을 측정된 실험 결과를 도시한다. 도 15는 멸균 및/또는 탈세포화 후 각각의 SIS 조성물에 대한 bFGF 효소 결합 면역분석(ELISA) 결과(시료의 건조 중량에 의해 표준화됨)를 도시한다.

도 16은 여러 방법으로 처리한 후의 SIS의 DNA 함량을 도시한다. 기선 측정치는 미처리된 것이다. 다음에, 조

직을 초임계 CO₂에 노출시킨 다음, 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO₂에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 17은 여러 방법으로 처리된 후의 SIS로부터 DNA의 제거율(%)을 도시한다. 기선 측정치는 미처리된 것이다. 조직을 초임계 CO₂에 노출시킨 다음 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO₂에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 18은 여러 방법으로 처리한 후의 SIS의 가변 활성 전환 성장 인자(TGF-beta) 함량을 도시한다. 기선 측정치는 Triton X-100 (TX-100) 단독으로 나중에 처리되는 원료상태 또는 미처리된 SIS이다. 다음에, 조직을 초임계 CO₂에 노출시킨 다음 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO₂에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 19는 여러 방법으로 처리한 후의 SIS의 가변 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF) 함량을 도시한다. 기선 측정치는 Triton X-100 (TX-100) 단독으로 나중에 처리되는 원료상태 또는 미처리된 SIS이다. 다음에, 조직을 초임계 CO₂에 노출시킨 다음 급속 감압(RDP)에 노출시켜서 DNA 및 세포 부스러기의 향상된 제거를 용이하게 했다. RDP 후, 그 조직을 멸균을 위해 과아세트산(PAA)과 함께 초임계 CO₂에 위치시켰다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

도 20은 급속 감압 후 SIS에의 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)의 첨가를 도시한다. 기선 측정치는 원료상태 또는 미처리된 SIS이다. 비교는 산화에틸렌(ETO)을 이용하여 멸균되거나 또는 멸균되지 않은 처리된 SIS에 대한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 발명은 하기의 상세한 설명, 실시예 및 특허청구범위, 및 이들의 이전 및 이후 설명을 참조하여 더욱 용이하게 이해될 수 있다. 그러나, 본 발명의 장치, 시스템 및/또는 방법을 개시 및 설명하기 전에, 개시된 특정 장치, 시스템 및/또는 방법은 변화할 수 있음은 물론 이므로 본 발명은 달리 명시하지 않는 경우 이러한 개시된 것들로 제한되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 특정 양상을 설명하기 위한 목적을 위한 것으로서, 제한되려는 것이 아님을 이해하여야 한다.

본 명세서 및 특허청구범위에서 사용되는 것으로, 단수형 "a," "an" 및 "the"는 달리 명백히 나타내지 않는 경우 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "부착 지점"에 대한 언급은 달리 나타내지 않는 경우 둘 이상의 부착 지점들을 포함할 수 있다.

본원에서 범위는 "대략적인" 하나의 특정 값 내지 "대략적인" 또 다른 특정 값으로 표시될 수 있다. 이러한 범위가 표시되는 경우, 또 다른 양상은 하나의 특정 값 내지 또 다른 특정 값을 포함한다. 마찬가지로, 값들이 선행사 "약"을 이용하여 근사치로 표시되는 경우, 그 특정 값은 또 다른 양상을 구성하는 것으로 이해된다. 또한, 각각의 범위의 종점은 다른 종점에 관련하여 유의하고 다른 종점과 무관하게 유의한 것으로 이해된다.

본원에서 사용되는 용어 "선택적" 및 "선택적으로"는 나중에 기재되는 경우 또는 상황이 일어나거나 일어나지 않을 수 있는 것을 의미하고 그 기재가 상기 경우 또는 상황이 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다.

본원에서 사용되는 것으로 단어 "또는"은 특정 목록의 어느 하나의 멤버를 의미하고 그 목록의 멤버들의 임의의 조합을 포함하기도 한다.

달리 명백히 나타내지 않는 경우, 본원에서 기재한 임의의 방법 또는 양상은 그 단계들이 특정 순서로 수행되어야 하는 것으로 결코 해석되지 않는다. 따라서, 방법 청구항이 특허청구범위 또는 설명에서 그 단계들이 특정 순서로 제한되는 것으로 기재하지 않는 경우, 순서가 추측된다는 것은 결코 아니다. 이는 단계들의 배열 또는 작동 흐름에 대한 논리의 문제, 문법적인 구성 또는 구두법으로부터 유래한 평범한 의미, 또는 본 명세서에서

기제한 양상들의 수 및 형태를 비롯하여, 해석을 위한 임의의 가능한 비표현 기준에 적용된다.

- [0020] 이러한 배타적인 용어를 사용하지 않고, 특허청구범위에서의 용어 "포함하는"은 특정 수의 구성요소들이 특허청구범위에 열거되는지 또는 특징의 부가가 특허청구범위에 기재된 구성요소의 특징을 변화시키는 것으로 간주될 수 있는 지에 상관없이 임의의 추가적인 구성요소의 포함을 인정하는 것이다. 본원에 구체적으로 정의한 것은 제외하고, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어들은 특허청구범위 유효성을 유지하면서 가능하면 넓게 일반적으로 사용되는 의미로 주어진다.
- [0021] 본원에서 사용되는 것으로, "개체"는 포유동물(예를 들어, 인간, 말, 돼지, 토끼, 개, 양, 염소, 비인간 영장류, 소, 고양이, 기니 피크, 또는 설치류), 어류, 새, 파충류 또는 양서류를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 상기 용어는 특정 연령 또는 성별을 나타내는 것이 아니다. 따라서, 성숙한 개체 및 신생 개체 외에도, 암컷 또는 수컷 태아가 포함된다. "환자"는 질병 또는 장애로 고생하는 개체이다. 용어 "환자"는 인간 및 수의학적 개체를 포함한다. 본원에서 사용되는 것으로 용어 "개체"는 용어 "환자"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0022] 본원에서 사용되는 용어 "주변"(circumference)은 닫힌 평면도형의 주변 또는 그 도형에 의해 한정되는 경계선의 길이를 의미한다. 선택적으로, 본원에서 사용되는 것으로 "주변"은 닫힌 평면 원의 주변에 해당할 수 있다. 그러나, "주변"은 예를 들어 제한 없이, 타원, 정사각형, 직사각형, 사다리꼴, 또는 비대칭적인 닫힌 평면 도형과 같은 임의의 닫힌 평면 도형의 주변에 해당할 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 것으로 도관의 외측 "주변"은 그 도관의 긴 축을 따른 특정 위치에서 그 도관의 외측 표면에 의해 한정되는 닫힌 평면 도형의 주변에 해당한다.
- [0023] 본원에서 사용되는 용어 "절두 원뿔형"(frusto-conical)은 그의 기부에 대하여 평행한 평면에 의해 끝이 잘린 원뿔의 형상에 해당하는 원뿔형 절두체의 형상을 의미한다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "절두 원뿔형"은 그의 세로축을 따라 직경이 변화하는 실질적으로 원형 단면을 갖는다. 따라서, 본원에서 개시한 "절두 원뿔형"은 각각 외측 주변이 있는 입구 부분 및 출구 부분을 갖는다. 선택적으로, 개시된 "절두 원뿔형" 도관의 출구 부분의 외측 주변은 그 "절두 원뿔형" 도관의 입구 부분의 외측 주변보다 클 수 있다. 그렇지 않으면, 개시된 "절두 원뿔형" 도관의 출구 부분의 외측 주변은 그 "절두 원뿔형" 도관의 입구 부분의 외측 주변보다 작을 수 있다. 예시적인 양상에서, 개시된 "절두 원뿔형" 도관의 출구 부분의 외측 주변은 그 "절두 원뿔형" 도관의 입구 부분의 외측 주변과 실질적으로 동일할 수 있다.
- [0024] 본원에서 사용되는 것으로 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 80%가 되도록 적어도 80% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 설명하기 위해 사용되는 것이다. 본원에 기재된 몇몇의 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 90%가 되도록 적어도 90% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 다른 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 95%가 되도록 적어도 95% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 다른 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 96%가 되도록 적어도 96% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 여전히 다른 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 97%가 되도록 적어도 97% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 추가의 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 98%가 되도록 적어도 98% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 본원에 기재된 여전히 추가의 예시적인 양상에서, 용어 "무세포성"은 세포 및/또는 세포 찌꺼기가 없이 세포의 기질 조성물이 적어도 99%가 되도록 적어도 99% 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "무세포성"은 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 및 이들 값들의 사이에 속하는 임의의 비율의 수준으로 탈세포화되는 세포의 기질 조성물을 의미할 수 있다.
- [0025] 본원에서 사용되는 용어 "첨가제"는 개시된 ECM 물질에 선택적으로 혼입되어 본원에 개시된 평균 무세포성 ECM 조성물에 예정 특성을 부여할 수 있는 물질을 말한다. 이러한 첨가제로는 예를 들어 제한 없이, 성장 인자, 시토킨, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸(GAGs), 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자, 세포 및 약학적 약물, 예를 들어 스타틴 약물, 코르티코스테로이드, 항부정맥제, 비스테로이드성 항염 약물, 기타 항염 화합물, 나노입자, 및 금속 화합물을 들 수 있다.
- [0026] 본원에서 사용되는 용어 "동시에"는 상황들이 동시 및/또는 겹쳐서 일어나는 것 외에도, 상황들이 서로를 전후

하여 약 30분 이내에 순차적으로 일어나는 것을 말한다. 따라서, 첫 번째 상황이 일어나는 경우, 두 번째 상황이 첫 번째 상황과 동시에 일어나거나 첫 번째 상황 전 또는 후에 30 분 이내에 일어난다고 말할 수 있다. 예를 들어, 첫 번째 방법 단계가 수행되는 경우, 그 첫 번째 방법 단계 후 5분 후에 수행된 두 번째 방법 단계는 첫 번째 방법 단계와 동시에 수행된다고 말할 수 있다. 마찬가지로, 두 번째 방법 단계가 세 번째 방법 단계 전 10 분 전에 수행된 경우, 그 두 번째 방법 단계는 세 번째 방법 단계와 동시에 수행된다고 말할 수 있다.

[0027] 본원에서 사용되는 용어 "초임계"는 그의 임계 온도 및 임계 압력 이상에서 유지되는 경우의 물질의 유체 상태를 말한다. 물질이 그의 임계 온도 및 임계 압력 이상에서 유지되는 경우, 이는 일반적으로 기체 및 액체 모두의 기능적 특성을 채택하고 초임계 유체로서 작용한다고 말한다. 따라서, 예를 들어, 이산화탄소가 이의 임계 온도(31.1 °C) 및 이의 임계 압력(1,071 psi) 이상에서 유지되는 경우, 이는 초임계 이산화탄소 유체로서 거동하고, 예를 들어, 액체의 밀도를 가지면서 기체의 팽창 특성을 나타낼 수 있다.

[0028] 본원에서는 세포의 기질(ECM) 물질 도관을 제조 및 사용하는 방법을 도 1 내지 도 3을 참조하여 설명한다. 하나의 양상에서, 도 2 내지 도 3에 도시한 바와 같이, 예시적인 ECM 물질 도관(10)은 내강(12)을 한정하고 입구 부분(14) 및 출구 부분(18)을 가질 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 입구 부분(14)은 내강(12)의 입구(16)를 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)은 내강(12)의 출구(20)를 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0029] 추가의 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 입구 부분(14) 및 출구 부분(18)은 각각 외측 주변을 가질 수 있다. 하나의 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)의 외측 주변은 ECM 물질 도관의 입구 부분(14)의 외측 주변과 실질적으로 동일할 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 실질적으로 원통형일 수 있다. 또 다른 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)의 외측 주변은 그 ECM 물질 도관의 입구 부분(14)의 외측 주변보다 클 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 실질적으로 절두원뿔형일 수 있다. 추가의 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)의 외측 주변은 그 ECM 물질 도관의 입구 부분(14)의 외측 주변보다 작을 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 실질적으로 절두원뿔형일 수 있다.

[0030] 하나의 양상에서, ECM 물질 도관은 세로 축(24) 및 약 10 mm 내지 약 50 mm의 세로 길이를 가질 수 있는 것으로 예상된다. 또 다른 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 입구 부분(14) 및 출구 부분(18)의 외측 주변은 각각 25 mm 내지 약 190 mm의 범위일 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, ECM 물질 도관(10)의 입구 부분(14) 및 출구 부분(18)에서, ECM 물질 도관의 내강(12)은 약 8 mm 내지 약 60 mm의 범위의 직경을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 두께가 있는 벽(22)을 가질 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 벽(22)의 두께는 약 0.05 mm 내지 약 3.00 mm의 범위일 수 있는 것으로 예상된다.

[0031] 하나의 예시적인 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)은 ECM 물질 도관(10)으로부터 외측으로 돌출하는 하나 이상의 연장 부분을 포함할 수 있다. 그 연장 부분은 자연 기능성을 더욱 면밀하게 모방하는 부착 구조를 유두근에 제공하도록 구성될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 연장 부분은 ECM 물질 도관(10)에 부착되는 자연 유두근과 본원에 개시한 바와 같은 ECM 물질 도관의 이식 후에 형성되는 재생된 AV 판막 사이의 융합을 촉진하도록 구성될 수 있는 것으로 예상된다.

[0032] 예시적인 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)이 본원에 기재한 바와 같은 적어도 하나의 연장 부분을 갖는 경우, 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점 중 하나 이상은 상기 적어도 하나의 연장 부분의 해당하는 연장 부분에 위치할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 상기 적어도 하나의 연장 부분은 세개의 연장 부분을 가지면서, 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점들이 각각의 연장 부분에 위치하는 것으로 예상된다.

[0033] 예시적인 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관은, 예를 들어 제한 없이 점막 층 및 성분, 점막하 층 및 성분, 근육 층 및 성분, 및/또는 기저 막 층 및 성분을 비롯한 임의의 알려진 ECM 성분 또는 물질을 포함할 수 있다. 개시된 ECM 물질 도관은, 예를 들어 제한 없이 위조직(예, 위 점막하층(SS)), 소장조직(예, 소장 점막하층(SIS)), 대장 조직, 방광 조직(예, 비뇨 방광 점막하층(UBS)), 간조직(예, 간기저막(LBM)), 심장 조직(예, 심낭막), 폐 조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수뇨관, 정맥, 동맥, 혈관이 부착되어 있거나 부착되어 있지 않은 심장 판막, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직을 비롯한, 임의의 포유동물 조직 소스로부터 얻은 ECM 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 물질 심장 판막은 예를 들어 제한 없이, 인간, 소, 돼지, 개, 양, 고양이, 말, 설치류 등을 비롯한 한 종 이상의 포유동물의 ECM 성분 또는 물질로부터 얻은 ECM 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 개시된 ECM 물질 도관은 둘 이상의 동일 포유동물 종, 예를 들어 제한 없이, 둘 이상의 소, 둘 이상의 돼지, 둘 이상의 개,

또는 둘 이상의 양으로부터 유래한 ECM 성분 또는 물질을 포함하는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 물질 도관은 둘 이상의 상이한 포유동물 종, 예를 들어 제한 없이, 돼지와 소, 돼지와 개, 돼지와 양, 또는 소와 양으로부터 유래한 ECM 성분 또는 물질을 포함하는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 ECM 물질 관막 도관은 제 1 포유동물 유래의 예를 들어 제한 없이 SIS와 제 1 조직 소스로부터 얻은 ECM 성분 또는 물질 외에도, 제 2 포유동물 유래의 예를 들어 제한 없이 SS와 같은 제 2 조직 소스로부터 얻은 ECM 성분 또는 물질을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0034]

여러 가지 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관(10)은 ECM 물질로 이루어진 실질적으로 평평한 시트로부터 형성될 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 ECM 물질의 시트의 제 1 가장자리를 이에 대향한 ECM 물질의 시트의 제 2 가장자리에 고정하여 ECM 물질 도관의 내강(12)이 한정되도록 함으로써 형성될 수 있다. 상기 ECM 물질의 시트의 제 1 가장자리는, 예를 들어 제한 없이 비흡수성 봉합사, 흡수성 봉합사, 외과용 페이스트, 외과용 접착제, 단섬유(staple) 등을 비롯한 임의의 통상적인 외과용 부착 수단을 이용하여 ECM 물질의 시트의 제 2 가장자리에 고정될 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, ECM 물질의 시트의 제 1 가장자리를 이에 대향한 ECM 물질 시트의 제 2 가장자리에 부착하기 위해 비흡수성 봉합사가 사용되는 경우, 상기 비흡수성 봉합사는 ECM 물질 도관의 외측 표면에 위치함으로써, ECM 물질 도관의 내강에 위치하는 봉합사의 부분을 감소시킬 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 선택적인 양상에서, ECM 물질의 시트의 제 2 가장자리는 ECM 물질의 시트의 제 1 가장자리와 겹치도록 고정될 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, ECM 물질 시트의 제 1 및 제 2 가장자리가 겹치는 ECM 물질 도관(10)의 부분은 ECM 물질 도관의 내강을 중심으로 외전(eversion)될 수 있는 것으로 예상된다. 또 다른 선택적인 양상에서, ECM 물질 시트의 제 2 가장자리는 ECM 물질 도관의 제 1 가장자리와 실질적으로 나란히 고정될 수 있는 것으로 예상된다.

[0035]

추가 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관(10)은, 예를 들어 제한 없이 천연 SIS 층의 내강 부분과 같은 미가공된 내강 ECM 물질로 이루어진 부분을 적어도 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 미가공 ECM 물질은 내강을 한정한다.

[0036]

추가 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관(10)은 시험관내 방법을 이용하여 원통형 맨드릴(mandrel)의 외측 표면 상에서 예를 들어 제한 없이 섬유아세포와 같은 세포를 성장시킴으로써 형성될 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 맨드릴의 외측 표면 상에서 세포를 성장시키면 한 종 이상의 ECM 물질이 생성될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질 도관(10)은 본원에 개시한 바와 같은 알려진 방법을 이용하여 탈세포화될 수 있는 것으로 예상된다.

[0037]

추가 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관(10)은 알려진 방법을 이용하여 동결건조될 수 있다. 추가 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관(10)이 동결건조되는 경우, 그 ECM 물질 도관은 알려진 방법을 이용하여 수화될 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 그 동결건조된 ECM 물질 도관은 멸균수, 식염 용액 또는 평형 염 용액에서 약 5 분 내지 약 30 분 동안 수화될 수 있는 것으로 예상된다.

[0038]

선택적으로, 개시된 ECM 물질 도관(10)은 둘 이상의 ECM 물질 층들로 구성된 다층 구조일 수 있다. 하나의 예시적인 양상에서, 다층 ECM 물질 도관(10)은 미가공 ECM의 내강 부분으로부터 형성될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "내강의"(lumenal)는 내강을 한정하는 물질의 부분을 의미한다. 이러한 양상에서, 미가공 내강 ECM은 제 1 말단 및 제 2 말단을 가질 수 있고 내강을 한정할 수 있다. 선택적으로, 미가공 ECM의 제 1 말단은 제 2 말단에 도달할 때까지 내강 안으로 뒤집어 짐으로써 다층 ECM 도관을 생성할 수 있다. 그렇지 않으면, 미가공 SIS의 제 1 말단은 제 2 말단에 도달할 때까지 외전됨으로써 다층 ECM 물질 도관을 생성할 수 있다. 추가 양상에서, 상기 다층 ECM 물질 도관은 알려진 방법을 이용하여 동결건조됨으로써 다층 적층 ECM 물질 도관을 생성할 수 있다. 하나의 선택적인 양상에서, 상기 다층 ECM 물질 도관은 동결 건조 동안 맨드릴(mandrel)에 위치할 수 있다. 추가의 선택적인 양상에서, 상기 다층 ECM 물질 도관의 동결 건조 동안, 저온풍선(cryoballoon)이 다층 ECM 물질 도관의 내강 내에 위치한 다음, 팽창하여 그 다층 ECM 물질 도관의 층들을 일체로 밀어낼 수 있다. 또한, 임의의 통상적인 적층(lamination) 방법을 이용하여 다층 ECM 물질 도관의 층들을 서로 적층함으로써 다층 적층 ECM 물질 도관을 형성할 수 있는 것으로 예상된다.

[0039]

하나의 양상에서, 개시된 ECM 물질 도관(10)은 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 포함할 수 있다. 예시적인 양상에서, 이러한 멸균 무세포성 조성물은 분리된 ECM 물질을 멸균과 동시에 탈세포화함으로써 형성될 수 있다. 더욱 구체적으로, 하기의 방법에서 개시한 바와 같이, 상기 분리된 ECM 물질의 원하는 멸균 및 탈세포화는 동시에 일어나서 그 조직 조성물의 본래의 특성이 유지되고 ECM 물질이 멸균 및 무세포성이 되도록 할 수 있다.

[0040]

예시적인 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 그 ECM 물질 도관의 입구 및/또는 출구 부분에 근접한 다층 구조를 가

질 수 있다. 이러한 양상에서, 그 ECM 물질 도관의 적어도 말단은 그 ECM 물질 도관의 일부분을 따라 외전(everted) 또는 내전(inverted) 됨으로써 그 ECM 물질 도관의 입구 및/또는 출구에 근접한 다층 구조를 형성할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 그 다층 구조는 ECM 물질 도관을 위한 봉합 링으로 효과적으로 작용할 수 있는 것으로 예상된다.

[0041] ECM 물질 도관에서 사용하기 위한 ECM 조성물의 멸균/탈세포화

[0042] 본원에 기재한 바와 같이, 개시된 방법은 분리된 ECM 물질의 급속 감압을 이용하여 ECM 물질이 무세포성이 되도록 탈세포화한다. 이러한 ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 방법에서 적용되는 감압 속도보다 유의하게 높은 감압 속도로 일어난다. ECM 물질을 본원에서 기재한 바와 같이 탈세포화하는 외에도, ECM 물질의 급속 감압은 ECM 물질에 원하는 멸균제 및 첨가제의 혼입하기 위해서도 사용될 수 있다.

[0043] 선택적으로, 개시된 ECM 관막 도관의 ECM 물질은, 예를 들어 제한 없이 NovaSterilis, Inc.사에 양도된 미국특허 7,108,832호에 기재된 장치와 같은 알려진 멸균 장치를 이용하여 멸균될 수 있는 것으로 예상된다. 상기 특허는 그 전체가 본원에 참조로 특별히 포함된다. 따라서, 몇몇 양상에서, 개시된 방법을 수행하기 위하여 사용된 장치는 표준 압축식 저장 실린더 및 부스터(boosters)와 함께 작동하도록 사용되는 표준 공기 압축기를 포함할 수 있다(예를 들어, Haskel Booster AGT 7/30). 다른 양상에서, 상기 공기 압축기 및 부스터는 단일 압축기로 대체될 수 있다. 예시적인 양상에서, 압축식 저장 실린더는 이산화탄소를 수용하도록 구성될 수 있고, 부스터는 이산화탄소 부스터일 수 있다.

[0044] 상기 장치는 저장소에 함유된 한 종 이상의 첨가제가 밸브 및 첨가 라인을 통해 반응 용기에 첨가될 수 있도록 하는 입구를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "반응 용기"는 ECM 물질을 수용하고 그 ECM 물질이 본원에 개시한 바와 같은 한 종 이상의 멸균제 및 첨가제에 노출될 수 있도록 구성되는 내부 공간을 갖는 임의의 용기를 말한다. 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 제한 없이, 바스켓, 버킷, 배럴, 박스, 및 다른 알려진 용기일 수 있다. 하나의 양상에서, 상기 반응 용기는 ECM 물질이 채워지는 주사기일 수 있는 것으로 예상된다.

[0045] 예를 들어 제한 없이 이산화탄소와 같은 선택된 주요 멸균제가 밸브 및 공급 라인을 통해 헤더 라인(header line)으로부터 도입될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 예를 들어 제한 없이 0.5 μ m 필터와 같은 필터가 용기로부터 물질의 이탈을 방지하기 위해 공급 라인에 제공될 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 압력이 육안으로 확인할 수 있도록 헤더 라인의 섷-오프 밸브(shut-off valve)의 하류측에 압력 게이지가 제공될 수 있다. 유체 흐름이 부스터로 역류하는 것을 방지하기 위하여 밸브의 상류 측의 헤더 라인에 체크 밸브가 설치될 수 있다. 헤더 라인에 과압 조건이 존재하는 것을 방지하기 위하여, 압력 조절 밸브가 선택적으로 설치될 수 있다.

[0046] 하나의 양상에서, 상기 반응 용기의 감압은 반응 용기와 소통하는 배출 라인 및 밸브를 이용하여 달성될 수 있다. 이러한 양상에서, 감압된 유체는 공급 라인을 통해 용기로부터 배출되고, 필터 유닛을 통해 여과된 다음, 분리기로 이송되어, 이산화탄소와 같은 여과된 유체가 배출 라인을 통해 배출될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상류측 성분들의 유체 분리가 가능하도록 장치의 여러 라인에 밸브가 포함될 수 있는 것으로 예상된다.

[0047] 하나의 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 예를 들어 제한 없이 316 게이지 스테인리스 강과 같은 스테인리스 강을 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기는 멸균되는 물질을 실험실 규모 또는 상업적인 규모로 수용하기에 충분한 전체 내용적을 가질 수 있다. 예를 들어, 반응 용기는 약 8 인치의 길이, 약 2.5 인치의 내경, 및 약 600 mL의 내용적을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 반응 용기는 진동기, 온도 제어 유닛, 및 임펠러 및 자성 드라이버를 포함하는 기계적 교반 장치를 포함할 수 있다. 하나의 선택적인 양상에서, 반응 용기는 316 게이지 스테인리스 강을 포함하는 바스켓을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 상기 바스켓은 멸균될 물질을 유지하면서 임펠러를 보호하고 주요 멸균제를 예정 방법으로 전달하도록 구성될 수 있는 것으로 예상된다.

[0048] 상기 반응 용기는 튼(splashing) 또는 난류로 인한 물질의 손실이 없이 그리고 역확산에 의한 압력 라인의 오염이 없이 지속적인 가압 및 감압(압력 사이클) 하에서 또는 일정한 압력에서 조작될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 장치내의 밸브들은 그 장치의 다른 구성요소들로부터 반응 용기의 용이한 분리 및 제거를 가능하게 하는 것으로 예상된다. 하나의 양상에서, 반응 용기의 상부는 감압시 제거되어 반응 용기의 내부 공간에의 접근이 가능하도록 할 수 있다.

[0049] 선택적으로, 상기 장치는 사용자가 반응 용기내의 온도를 조절하도록 할 수 있도록 하는 온도 조절 유닛을 포함

할 수 있다.

- [0050] 사용 시, 개시된 장치는 본원에 개시한 바와 같은 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하는 방법에서 이용될 수 있다. 그러나, 개시된 장치는 단지 예시적인 것으로서, 개시된 방법 단계들을 수행할 수 있는 임의의 장치가 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하기 위해 이용될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 청구한 방법은 결코 특정 장치로 제한되는 것이 아니다.
- [0051] 콜로니 형성 단위(CFUs)의 유의한 감소는 분리된 ECM 물질을 주요 멸균제를 이용하여 멸균 온도 및 압력 조건에 처하게 함으로써 개시된 방법에 따라 달성될 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 주요 멸균제는 원하는 멸균을 달성하기 위해 한 종 이상의 보조 멸균제와 결합될 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 얻어지는 ECM 조성물에 원하는 특성을 부여하기 위해, 선택된 첨가제들이 ECM 물질에 혼입될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 개시된 방법은 개체의 신체내에 이식하기 위한 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하기 위해 이용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0052] 본원에 기재한 바와 같이, 개시한 방법은 ECM 물질이 무세포성이 되도록 하기 위하여 분리된 ECM 물질의 급속 감압을 이용한다. 이러한 ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 방법에서 적용되는 감압 속도보다 유의하게 높은 감압 속도로 일어난다. 전술한 바와 같이 ECM 물질이 무세포성이 되도록 하는 외에도, ECM 물질의 급속 감압은 ECM 물질내로 원하는 멸균제 및 첨가제의 혼입을 강화하기 위해서도 사용될 수 있다. 또한, ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 탈세포화 방법과 비교하여 천연 성장 인자의 유지를 개선하면서 ECM 물질이 무세포성이 되도록 할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질의 급속 감압은 예전에 알려진 탈세포화 방법과 비교하여 ECM 물질의 인장 강도의 유지를 개선하기 위하여 사용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0053] 개시한 방법은 ECM 조성물의 기계적 강도 및 생물학적 특성을 유의하게 약화시키지 않는 외에도, 상기 방법은 ECM 조성물을 탈세포화하고 ECM 조성물에의 여러 첨가제의 혼입을 강화하는데 있어서 더욱 효과적이다. 따라서, 개시한 멸균 및 탈세포화 방법은 당업계에 알려진 ECM 조성물과 비교하여 더욱 많이 탈세포화되고 더욱 많은 첨가제를 혼입 및 전달하기 위한 더욱 큰 능력을 갖는 ECM 조성물을 제공한다. 또한, 개시한 멸균 및 탈세포화 방법은 당 업계에 알려진 멸균 및 탈세포화된 ECM 조성물과 비교하여 더욱 많은 양 및/또는 농도의 보유된 천연 성장 인자를 갖고 더욱 큰 인장 강도를 갖는 ECM 조성물을 제공한다.
- [0054] 예시적인 양상에서, 주요 멸균제는 그의 초임계 압력 및 온도 조건 또는 그 조건 근처에 있는 이산화탄소일 수 있다. 그러나, 예를 들어 ECM 물질의 본래의 특성을 방해하지 않는 기체, 액체 또는 분말 멸균제를 비롯한 임의의 통상적인 멸균제가 주요 멸균제로서 사용될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0055] 하나의 예시적인 양상에서, 개시한 멸균 공정은 약 1000 내지 약 3500 psi의 압력 및 약 25 °C 내지 약 60 °C의 온도에서 주요 멸균제로서 이산화탄소를 이용하여 실시될 수 있다. 더욱 바람직하게, 초임계 이산화탄소가 사용되는 경우, 그 멸균 공정은 약 1,071 psi 이상의 압력 및 31.1°C 이상의 온도에서 주요 멸균제로서 이산화탄소를 이용할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 멸균하고자 하는 ECM 물질은 약 10 분 내지 약 24 시간, 더욱 바람직하게는 약 15 분 내지 약 18 시간, 가장 바람직하게는 약 20 분 내지 약 12 시간 동안 그러한 압력 및 온도 조건 또는 그 조건 근처에서 이산화탄소에 노출될 수 있다. 바람직하게, 개시한 장치 및 방법에서 이용되는 이산화탄소는 순수하거나, 그렇지 않으면, 이산화탄소의 멸균 특성을 저해하지 않는 미량의 다른 기체를 함유할 수 있다. 하기의 설명을 용이하게 하기 위하여, 용어 "초임계 이산화탄소"가 사용되지만, 이러한 용어는 전술한 바와 같은 압력 및 온도 범위 내의 이산화탄소가 개시한 방법의 실시에서 만족스럽게 이용될 수 있다는 점에서 비제한적인 것이다. 개시한 압력 및 온도 범위 내에서, 이산화탄소는 기체, 액체, 유체 또는 플라즈마 형태로 ECM 물질에 제시될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0056] 몇몇 양상에서, 개시한 방법에서 이용되는 보조 멸균제로는, 예를 들어 제한 없이 과산화물 및/또는 카르복시산과 같은 화학적 멸균제가 있다. 바람직한 카르복시산으로는 알칸카르복시산 및/또는 알칸퍼카르복시산이 있는데, 이들은 각각 할로젠, 산소 및 질소 기와 같은 한 종 이상의 전자끄는 치환기로 알과 카본에서 선택적으로 치환될 수 있다. 개시한 방법의 실시에서 이용되는 화학적 멸균제의 예로는 종으로는 예를 들어 제한 없이 과산화수소(H₂O₂), 아세트산(AcA), 과아세트산(PAA), 트리플루오로아세트산(TFA), 및 이들의 혼합물 등이 있다. 하나의 예시적인 양상에서, 화학적 멸균제로는 아세트산, 과산화수소 및 과아세트산을 포함하는 혼합물인 Sporeclenz® 멸균제를 들 수 있다.
- [0057] 보조 멸균제는 주요 멸균제의 전체 부피를 기준으로 적어도 약 0.001 부피% 이상의 멸균 강화에 효과적인 양으로 이용될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 보조 멸균제의 양은 이용되는 특정 멸균제에 의존할 수 있는 것으로

로 예상된다. 따라서, 예를 들어, 과아세트산은 약 0.005 부피% 이상의 비교적 소량으로 존재하는 반면에, 아세트산은 약 1.0 부피% 이상의 양으로 이용될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 보조 멸균제의 농도는 약 0.001 부피% 내지 약 2.0 부피%일 수 있고, 일반적으로 예를 들어 초임계 이산화탄소와 같은 개시한 주요 멸균제와의 조합으로 멸균 강화 효과를 달성하기 위해 본원에 개시한 바와 같이 사용될 수 있는 것으로 예상된다.

[0058]

하나의 양상에서, 멸균된 무세포성 ECM 조성물을 제조하는 방법은 선택된 조직을 포유동물로부터 수득하고, 예를 들어 제한 없이 링거액 또는 평형 생리학적 염 용액을 비롯한 멸균수 또는 다른 생체적합성 액체에서 상기 선택된 조직을 세척하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 선택된 조직은, 예를 들어 제한 없이 위 조직(예, 위점막하층(SS)), 소장조직(예, 소장 점막하층(SIS)), 대장 조직, 방광 조직(예, 비뇨 방광 점막하층(UBS)), 간조직(예, 간기저막(LBM)), 심장 조직(예, 심낭막, 외심막, 심장내막, 심근막), 폐조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수노관, 정맥, 동맥, 혈관이 부착되어 있거나 부착되지 않은 심장 판막, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직일 수 있다. 또 다른 양상에서, 상기 방법은 상기 선택된 조직을 약 12 내지 약 36 시간, 더욱 바람직하게는 약 18 내지 약 30 시간, 가장 바람직하게는 약 22 내지 약 26 시간 동안 동결하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 선택된 조직이 동결되는 시간은 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 24 시간, 25 시간, 26 시간, 27 시간, 28 시간, 29 시간, 30 시간, 31 시간, 32 시간, 33 시간, 34 시간, 35 시간, 36 시간, 및 상기 값들의 사이에 속하는 임의의 다른 시간일 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 상기 방법은 상기 선택된 조직을 차가운 저장(hypotonic) 트리스 완충액에서 해동하는 것을 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 양상에서, 상기 방법은 5 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 갖는 얼음 상의 차가운 저장 트리스 완충액에서 상기 선택 조직을 해동하는 것을 포함할 수 있다. 예시적인 양상에서, 상기 선택된 조직을 동결 및 해동하는 단계들은 주기적으로 6회까지 반복될 수 있는 것으로 예상된다.

[0059]

또 다른 양상에서, 상기 방법은 선택된 조직으로부터 ECM 물질을 분리하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질은, 예를 들어 제한 없이 위조직(예, 위점막하층(SS)), 소장조직(예, 소장 점막하층(SIS)), 대장 조직, 방광 조직(예, 비뇨 방광 점막하층(UBS)), 간조직(예, 간기저막(LBM)), 심장 조직(예, 심낭막, 외심막, 심장내막, 심근막), 폐조직, 신장 조직, 췌장 조직, 전립선 조직, 중피 조직, 태아 조직, 태반, 수노관, 정맥, 동맥, 혈관이 부착되어 있거나 부착되지 않은 심장 판막, 발생하는 치아의 뿌리 주변의 조직, 및 성장하는 뼈 주변의 조직을 비롯한 알려진 세포의 기질 성분을 포함하는 임의의 물질일 수 있다. 하나의 예시적인 비제한적 양상에서, ECM 물질을 분리하는 단계는 포유동물의 조직 소스로부터 SIS를 분리하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 방법은 소장의 세로축에 실질적으로 평행한 경로를 따라 소장의 벽을 절개하고; 상기 절개 경로를 따라 소장을 열어서 소장이 표면에 평평하게 놓이도록 하고; 소장을 멸균 식염수 또는 다른 생체적합성 유체로 세척하고; 주변의 평활근 및 장막층 및 점막층으로부터 소장의 SIS를 기계적으로 벗겨내서, 본질적으로 점막하층 및 기저막층이 남도록 하는 것을 포함할 수 있다. 그러나, ECM 물질은 그 각각의 전체가 참조로 본원에 명백히 포함되는 다음 문헌들에 기재된 것들을 비롯한 임의의 기법을 이용하여 분리될 수 있는 것으로 예상된다: 미국특허 제 4,902,508호; 미국특허 제 5,275,826호; 미국특허 제 5,281,422호; 미국특허 제 5,554,389호; 미국특허 제 6,579,538호; 미국특허 제 6,933,326호; 미국특허 제 7,033,611호; Voytik-Harbin 등, "Identification of Extractable Growth Factors from Small Intestinal Submucosa," J. Cell. Biochem., Vol. 67, pp. 478-491 (1997); Hodde 등, "Virus Safety of a Porcine-Derived Medical Device: Evaluation of a Viral Inactivation Method," Biotech. & Bioeng., Vol. 79, No. 2, pp. 211-216 (2001); Badylak 등, "The Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Reconstruction," Cell & Developmental Biology, Vol. 13, pp. 377-383 (2002); Robinson 등, "Extracellular Matrix Scaffold for Cardiac Repair," Circulation, Vol. 112, pp. I-135-I-143 (2005); Hodde 등, "Effects of Sterilization on an Extracellular Matrix Scaffold: Part I. Composition and Matrix Architecture," J. Mater. Sci.: Mater. Med., Vol. 18, pp. 537-543 (2007); 및 Hodde 등, "Effects of Sterilization on an Extracellular Matrix Scaffold: Part II. Bioactivity and Matrix Interaction," J. Mater. Sci.: Mater. Med., Vol. 18, pp. 545-550 (2007).

[0060]

추가적 양상에서, 상기 방법은 분리된 ECM 물질을 인산염 완충액(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Lonza Walkersville, Inc.사))에서 5 mM EDTA이 첨가된 0.5-1% Triton X-100/0.5-1% 데옥시콜린에서 24 내지 48 시간 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 위점막하층(SS), 소장 점막하층(SIS) 및 방광 점막하층(UBS)과 같은 평평하거나 관형의 ECM 물질이 신장된 형태로 배양될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 온전한 수노관, 동맥, 정맥 및 관형 SIS와 같은 ECM 물질 도관 또는 다른 내강(luminal) ECM 물질에 침적을 통해 튜브 연동식 펌프를 이용하여 여러 가지 개시된 용액들이 관류될 수 있는 것으로 예상된다.

- [0061] 추가의 양상에서, 배양 후, 상기 방법은 ECM 물질을 DPBS로 세척하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질을 세척하는 단계는 ECM 물질을 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 또는 6회를 비롯한 6회까지 각 세척당 약 30 분간 세척하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, ECM 물질을 세척하는 단계는 ECM 물질을 각 세척당 약 30분씩 3회 세척하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.
- [0062] 선택적으로, 예시적인 양상에서, 상기 방법은 제 2 배양 과정을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 제 2 배양 과정은 5 mM EDTA가 첨가된 10-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 RNAase/0.2-0.5 $\mu\text{g/mL}$ DNAase를 함유하는 등장성 트리스 완충액에서 ECM 물질을 배양하는 것을 포함할 수 있다. 상기 등장성 트리스 완충액에서 ECM 물질을 배양하는 단계는 인체의 온도에 실질적으로 해당하는 약 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 수행될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 등장성 트리스 완충액에서 ECM 물질을 배양하는 단계는 약 30 분 내지 약 24 시간, 더욱 바람직하게는 약 1 시간 내지 약 18 시간, 가장 바람직하게는 약 2 시간 내지 약 12 시간 동안 수행될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 상기 제 2 배양 과정은 ECM 물질을 DPBS로 세척하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질을 세척하는 단계는 ECM 물질을 각 세척 당 30분씩 3회 세척하는 것을 포함하는 것으로 예상된다.
- [0063] 여전히 또 다른 양상에서, 제 2 배양 과정이 수행되는 지의 여부에 상관없이, 상기 방법은 ECM 물질을 약 1 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 10 $^{\circ}\text{C}$, 더욱 바람직하게는 약 2 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 6 $^{\circ}\text{C}$, 가장 바람직하게는 약 3 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하는 것을 포함할 수 있다. 예시적인 양상에서, ECM 물질은 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관될 수 있다.
- [0064] 추가의 양상에서, 상기 방법은 ECM 물질을 반응 용기의 내부 공간에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 양상에서, 저장소로부터의 한 종 이상의 멸균제들이 ECM 물질과 함께 반응 용기의 내부 공간에 첨가될 수 있다. 이러한 양상에서, 저장소로부터의 한 종 이상의 멸균제들이 ECM 물질보다 먼저, 이후 또는 동시에 반응 용기의 내부 공간에 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 반응 용기의 내부 공간에서 원하는 온도를 생성하기 위해 온도 조절 유닛이 선택적으로 조절될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, 상기 방법은 반응 용기 내부의 압력 및 저장 실린더 내부의 압력을 평형화하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 양상에서, 반응 용기 내부의 압력 및 저장 실린더 내부의 압력은 대기압과 실질적으로 동일할 수 있는 것으로 예상된다. 여전히 또 다른 양상에서, 장치 내부의 압력을 평형화한 후, 상기 방법은 자성 드라이버를 작동시켜서 반응 용기의 임펠러를 작동시키는 것을 포함할 수 있다. 여전히 추가의 양상에서, 상기 방법은 반응 용기 내부의 원하는 압력이 달성될 때까지 저장 실린더로부터 반응 용기내로 주요 멸균제를 추가로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 주요 멸균제를 반응 용기내로 선택적으로 도입하는 단계는 공기 압축기 및 부스터를 선택적으로 작동시켜서 반응 용기 내로의 주요 멸균제의 흐름을 증가시키는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 상기 공기 압축기 및 부스터는 ECM 물질이 초임계 이산화탄소를 생성하는데 필요한 압력 및 온도와 같은 초임계 압력 및 온도에 처하도록 약 20 분 내지 약 60 분간 작동될 수 있다.
- [0065] 추가의 양상에서, 상기 방법은 상기 반응 용기를 급속 감압하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 예를 들어 제한 없이 초임계 이산화탄소와 같은 예정된 양의 주요 멸균제가 반응 용기로부터 감압 라인을 통해 방출될 수 있다. 상기 주요 멸균제는 반응 용기에 결합된 밸브의 열림을 통해 반응기로부터 방출되어 반응 용기 내부의 압력을 감소시킬 수 있는 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 용어 "급속 감압"은 400 psi/min 이상의 속도로 반응기를 감압하는 것을 말한다. 예를 들어, 반응 용기는 약 2.9 MPa/min 내지 약 18.0 MPa/min (약 400 psi/min 내지 약 2,600 psi/min), 더욱 바람직하게는 약 5.0 MPa/min 내지 약 10.0 MPa/min (700 psi/min 내지 약 1,500 psi/min), 가장 바람직하게는 약 7.0 MPa/min 내지 약 8.0 MPa/min (약 1,000 psi/min 내지 약 1,200 psi/min)의 범위의 감압 속도로 급속 감압될 수 있는 것으로 예상된다. 따라서, 이러한 급속 감압은 미국 특허 제 7,108,832호에 기재된 300 psi/min의 감압 속도보다 유의하게 크다. 임의의 특정 이론에 구속되지 않고, 개시된 급속 감압 속도는 ECM 물질에서 달성되는 탈세포화의 수준을 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다. 예를 들어, 개시한 ECM 물질의 급속 감압은 96.1%, 96.2%, 96.3%, 96.4%, 96.5%, 96.6%, 96.7%, 96.8%, 96.9%, 97.0%, 97.1%, 97.2%, 97.3%, 97.4%, 97.5%, 97.6%, 97.7%, 97.8%, 97.9%, 98.0%, 98.1%, 98.2%, 98.3%, 98.4%, 98.5%, 98.6%, 98.7%, 98.8%, 98.9%, 99.0%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 및 100.0%를 비롯한, 약 96%보다 큰 ECM 물질 내의 탈세포화 수준으로 이어질 수 있는 것으로 예상된다.
- [0066] 예시적인 양상에서, 상기 방법은 한 종 이상의 첨가제를 ECM 물질에 혼입하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 한 종 이상의 첨가제는 분말이나 액체 형태로 제공될 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 혼입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압하는 단계 동안에 한 종 이상의 첨가제를 반응 용기에 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제의

도입은 통상의 발포(foaming) 공정으로 특징지어질 수 있다. 또 다른 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압한 후 반응 용기에 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 반응 용기의 급속 감압이 ECM 물질을 팽윤 및/또는 팽창시켜서 ECM 물질에의 첨가제의 침투를 개선한 후에 ECM 물질에 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 예시적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 반응 용기의 급속 감압 후 약 30 분 이내에 ECM 물질에 첨가될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 혼입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압하는 단계 동안 및 이후에 반응 용기에 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 반응 용기 내로 신속하게 또는 느리게 방출될 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 선택적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 혼입하는 단계는 반응 용기를 급속 감압하는 단계 이전에 반응 용기 내로 한 종 이상의 첨가제를 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[0067] 개시된 첨가제는 얻어지는 멸균 무세포성 ECM 조성물에 선택된 특성을 부여하기 위하여 ECM 물질에 혼입될 수 있다. 따라서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 본원에 개시된 바와 같은 ECM 물질의 처리 동안에 손실되는 ECM 물질의 성분들을 대체 또는 보충하도록 선택될 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 후술하는 바와 같이, 상기 한 종 이상의 첨가제는 성장 인자, 시토킨, 프로테오글리칸, 글리코사미노글리칸(GAGs), 단백질, 펩티드, 핵산, 소분자, 약물, 또는 세포를 포함할 수 있다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는 ECM 물질내로 비천연 성분을 혼입하기 위해 선택될 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 상기 한 종 이상의 첨가제는 예를 들어 제한 없이, 줄기 세포를 동원하기 위한 성장 인자, 항원성 시토킨, 및 항염 시토킨을 포함할 수 있다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는 스타틴, 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염 약물, 항염 화합물, 항부정맥제 등과 같은 약학적 약물일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 은 나노입자, 금 나노입자, 백금 나노입자, 이리듐 나노입자, 로듐 나노입자, 팔라듐 나노입자, 구리 나노입자, 아연 나노입자 및 다른 금속 나노입자와 같은 나노입자일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 한 종 이상의 첨가제는 금속 화합물일 수 있는 것으로 예상된다. 하나의 예시적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는 얻어지는 ECM 물질을 개체의 신체내로 이식한 후 면역 반응을 약학적으로 억제하기 위해 선택될 수 있다.

[0068] 하나의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 전환 성장인자- β 1, 2 또는 3(TGF- β 1, 2 또는 3), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)라고도 알려진 섬유아세포 성장 인자-2(FGF-2), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 태반 성장 인자(PGF), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린 유사 성장 인자(IGF), 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 상피 성장 인자(EGF), 및 전환 성장 인자- α (TGF- α)를 비롯한 한 종 이상의 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0069] 또 다른 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 줄기 세포 인자(SCF), 간엽 세포 유래 인자-1 (SDF-1), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터페론 감마(IFN-gamma), 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-10, 인터루킨-13, 백혈병 억제 인자(LIF), 암피레굴린(amphiregulin), 트롬보스폰딘 1(thrombospondin 1), 트롬보스폰딘 2, 트롬보스폰딘 3, 트롬보스폰딘 4, 트롬보스폰딘 5, 및 안지오텐신 전환 효소(ACE)를 비롯한 한 종 이상의 시토킨을 포함할 수 있다.

[0070] 추가의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 헤파란 설페이트 프로테오글리칸, 베타글리칸, 신데칸, 데코린, 어그리칸, 비글리칸, 피브로모듈린, 케라토칸, 루미칸, 에피피칸(epiphykan), 펠레칸(perlecan), 아그린(agrins), 테스트칸(testican), 신데칸(syndecan), 글리피칸(glypican), 서글리신(serglycin), 셀렉틴(selectin), 렉티칸(lectican), 버시칸(versican), 뉴로칸(neurocan) 및 브레비칸(brevican)을 비롯한 한 종 이상의 프로테오글리칸을 포함할 수 있다.

[0071] 추가의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 헤파란 설페이트, 히알루론산, 헤파린, 콘드로이틴 설페이트 B(더마탄 설페이트) 및 콘드로이틴 설페이트 A를 비롯한 한 종 이상의 글리코사미노글리칸을 포함할 수 있다.

[0072] 여전히 추가의 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 엘라스틴, 비트로넥틴, 베르시칸, 라미닌, 피브로넥틴, 피브릴린-1, 피브릴린-2, 플라스미노젠, 작은 루신 풍부 단백질, 세포 표면 관련 단백질, 세포 부착 분자(CAMs), 매트리카인, 기질 금속단백분해효소(MMP), 카드헤린, 면역글로불린, 멀티플렉신, 세포질 도메인-44(CD-44), 아말로이드 전구 단백질, 테나신(tenascin), 니도젠/엔탁신(nidogen/entactin), 피불린 I, 피불린 II, 인테그린, 막관통 분자(transmembrane molecules) 및 오스테오폰틴(osteopontin)을 비롯한 한 종 이상의 단백질, 펩티드 또는 핵산을 포함할 수 있다.

[0073] 여전히 또 다른 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제는, 예를 들어 제한 없이 스타틴 약물, 예를 들어 세레바스

타틴, 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 메바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 로슈바스타틴 및 심바스타틴, 코르티코스테로이드, 비스테로이드성 항염 약물, 항염 화합물, 항부정맥제, 항균제, 항생제 등을 비롯한 한 종 이상의 약학적 약물을 포함할 수 있다.

[0074] 예시적인 양상에서, 상기 한 종 이상의 첨가제를 반응 용기에 도입하는 단계는 밸브를 열어서 상기 한 종 이상의 첨가제를 저장소로부터 유입구로 이동시키는 것을 포함할 수 있다. 감압 전에, 상기 한 종 이상의 첨가제는 밀봉 전에 반응 용기에 직접 도입되고/되거나 유입구를 통해 도입될 수 있는 것으로 예상된다.

[0075] 상기 반응 용기의 개시된 급속 감압 또는 재감압은 한 종 이상의 첨가제를 첨가하거나 첨가하지 않고, 임의의 원하는 수의 주기 동안 반복될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 급속 감압 및 재감압의 주기 외에도, 주요 멸균제 및/또는 보조 멸균제 및/또는 첨가제의 도입은 원하는 압력 조건 및 주기를 달성하도록 장치의 여러 밸브를 선택적으로 열고/열거나 닫도록 구성되는 제어기를 통해 자동으로 제어될 수 있는 것으로 예상된다.

[0076] 몇몇 양상에서, 상기 개시된 방법은 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계는 진동기를 이용하여 반응 용기의 내용물을 주기적으로 교반하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 반응 용기의 교반은 간헐적, 계속적 또는 연속적일 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 상기 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계는 반응 용기내로 주요 멸균제를 도입하는 단계 동안에 일어날 수 있다. 상기 반응 용기의 내용물의 교반은 반응 용기내의 유체내의 보이드(void)를 제거하여 ECM 물질과 멸균제 및/또는 첨가제 사이의 접촉을 더욱 완전하게 함으로써 멸균제 및/또는 첨가제의 물질 전달을 향상시킬 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상기 반응 용기의 내용물을 교반하는 단계는 멸균 시간, 온도 및 가압/감압 주기를 최적화하도록 교반의 강도 및 기간을 선택적으로 조절하는 것을 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0077] 추가의 양상에서, ECM 물질의 멸균 및 탈세포화가 종료된 후, 상기 방법은 반응 용기를 감압하고 자성 드라이버를 불활성화하여 교반 임펄서의 운동을 멈추게 하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 끝으로, 상기 방법은 얻어지는 멸균 무세포성 ECM 조성물을 반응 용기의 상부를 통해 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[0078] ECM 물질 도관을 이용하여 심장 판막을 재생하는 방법

[0079] 또한, 본원에서는 심장 판막을 재생하는 방법을 개시한다. 예시적인 양상에서, 개체의 심장 내의 결합있는 방실(AV) 판막을 대체하기 위해 AV 판막을 재생하는 방법을 개시한다. 이러한 양상에서, 도 1을 참조하면, AV 판막은 개체의 심장의 심실과 심방 사이의 판막륜(annulus)에 부착되어 있고 개체의 심장 내의 다수의 유두근(32)들에 기능적으로 결합되는 것으로 예상된다. 본원에서 사용되는 용어 "방실 판막"은 개체의 심장 내의 승모(이첨) 판막이나 삼첨 판막을 의미할 수 있다. AV 판막이 승모 판막인 경우, 그 결합있는 AV 판막은 개체의 심장의 좌심방과 좌심실 사이의 판막륜에 부착되어 있는 것으로 예상된다. 또한, 결합있는 AV 판막이 삼첨 판막인 경우, 그 결합있는 AV 판막은 개체의 심장의 우심방과 우심실 사이의 판막륜에 부착되어 있는 것으로 예상된다.

[0080] 하나의 양상에서, 도 2를 참조하여, AV 판막을 재생하는 개시된 방법은 개체의 심장으로부터 결합있는 AV 판막을 제거하여 개체의 심장의 판막륜 영역(30)을 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "판막륜 영역"은 개체의 심장 내의 심방과 심실 사이의 판막륜의 본래 위치에 근접한 개체 심장 부분을 의미한다. 판막륜이 개체의 심장에 위치하는 경우, 판막륜 영역(30)은 판막륜 외에도 그 판막륜에 근접한 심장 근육을 포함한다. 판막륜이 개체의 신장으로부터 제거된 경우, 판막륜 영역(30)은 개체의 심장 내의 판막륜의 이전 위치에 근접한 심장 근육을 포함한다.

[0081] 하나의 선택적인 양상에서, 판막륜 영역(30)의 판막륜은 결합있는 AV 판막과 함께 개체의 심장으로부터 제거될 수 있는 것으로 예상된다. 또 다른 선택적인 양상에서, 결합있는 AV 판막에 부착되어 있는 건삭(chordae tendineae)이 결합있는 AV 판막과 함께 개체의 심장으로부터 제거될 수 있는 것으로 예상된다. 결합있는 AV 판막을 제거하는 단계는 심폐 우회로(cardiopulmonary bypass) 상에 개체를 위치시키는 것을 추가로 포함할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 결합있는 AV 판막을 제거하는 단계는 개체의 심장을 정지시키고/시키거나 피브릴화하고 개체의 심장의 심방 내의 절개부를 통해 그 결합있는 판막을 노출시키는 것을 추가로 포함할 수 있는 것으로 예상된다.

[0082] 추가의 양상에서, AV 판막을 재생하는 개시된 방법은 본원에 개시한 것과 같은 ECM 물질 도관(10)을 이식하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 본원에 개시한 바와 같이, ECM 물질 도관(10)은 내강(12)을 한정하고 입구 부분(14) 및 출구 부분(18)을 포함할 수 있는데, 그 입구 부분 및 출구 부분은 각각 외측 가장자리를 갖는

다. ECM 물질 도관(10)에 의해 한정되는 내강(12)은 ECM 물질 도관의 출구 부분(18)에 근접한 중심점(13)을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 추가의 양상에서, ECM 물질 도관(10)을 이식하는 단계는 ECM 물질 도관의 입구 부분(14)을 판막륜 영역(30)에 고정하고 ECM 물질 도관의 출구 부분을 다수의 유두근(32)중 적어도 두 개에 고정하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 판막륜이 개체의 심장으로부터 제거되지 않는 경우, ECM 물질 도관(10)의 입구 부분(14)이 판막륜에 고정될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 판막륜이 개체의 심장으로부터 제거되는 경우, ECM 물질 도관(10)의 입구 부분(14)이 그 제거된 판막륜의 본래 위치에 근접한 심장 근육에 고정될 수 있는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질 도관(10)은 예를 들어 제한 없이 비흡수성 봉합사, 흡수성 봉합사, 외과용 페이스트, 외과용 접착제, 단섬유(staple) 등을 비롯한 임의의 통상적인 외과용 부착 수단을 이용하여 판막륜 영역(30) 및/또는 유두근(32)에 고정될 수 있는 것으로 예상된다. 선택적으로, 하나의 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 판막륜 영역에 고정되기 전에 유두근(32)에 고정될 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)이 유두근(32)에 적절히 고정된 후, 세로 축(24)을 따른 ECM 물질 도관(10)의 길이는 필요에 따라 정돈되어 임의의 과도한 길이가 제거되면서 판막륜 영역(30)에의 ECM 물질 도관의 적절한 부착을 위한 충분한 조직이 유지되도록 할 수 있는 것으로 예상된다. 그렇지 않으면, 또 다른 양상에서, ECM 물질 도관(10)은 유두근(32)에 고정되기 전에 판막륜 영역(30)에 고정될 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)이 판막륜 영역(30)에 적절히 고정된 후, 세로 축(24)을 따른 ECM 물질 도관(10)의 길이는 필요에 따라 정돈되어 임의의 과도한 길이가 제거되면서 유두근(32)에의 ECM 물질 도관의 적절한 부착을 위한 충분한 조직이 유지되도록 할 수 있는 것으로 예상된다.

[0083]

선택적으로, 하나의 양상에서, 도 2 및 도 3을 참조하면, 개시된 방법은 개체의 심장 내의 이첨 AV 판막을 재생하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 양상에서, ECM 물질 도관(10)을 이식하는 단계는 다수의 유두근들 중 단지 2개의 유두근(즉, 제 1 유두근(32a) 및 제 2 유두근(32b))에 ECM 물질의 출구 부분(18)을 고정하는 것을 포함할 수 있다. 인식하게 되는 바와 같이, 좌심실은 단지 2개의 유두근을 갖는 반면에, 우심실은 3개의 유두근을 갖는다. 그럼에도 불구하고, 결합있는 AV 판막이 승모 판막인지 삼첨 판막인지에 상관없이, ECM 물질 도관에 의해 재생된 대체 AV 판막은 이첨 판막일 수 있는 것으로 예상된다. 결합있는 AV 판막이 삼첨 판막인 경우, 제 1 유두근(32a)은 우심실의 전방 유두근이고 제 2 유두근(32b)은 우심실의 후방 유두근일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 제 1 유두근(32a)이 우심실의 전방 유두근이고 제 2 유두근(32b)이 우심실의 중격 유두근일 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 제 1 유두근(32a)이 우심실의 후방 유두근일 수 있고 제 2 유두근(32b)이 우심실의 중격 유두근일 수 있는 것으로 예상된다.

[0084]

추가적 양상에서, ECM 물질 도관을 이식하는 단계는 제 1 부착 지점(34a)을 통해 제 1 유두근(32a)에 ECM 물질 도관(10)의 출구 부분을 고정하고 제 2 부착 지점(34b)을 통해 제 2 유두근(32b)에 고정하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 제 2 부착 지점(34b)은 ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)의 외측 주변을 따라 제 1 부착 지점(34a)으로부터 이격될 수 있는 것으로 예상된다. 여전히 또 다른 양상에서, 도 3을 참조하면, ECM 물질 도관(10)의 내강(12)의 중심점(13)은 제 1 부착 지점(34a)과 제 2 부착 지점(34b)의 사이에 형성된 각도(40)의 각점(vertex)에 해당할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 제 1 부착 지점과 제 2 부착 지점의 사이에 형성된 각도(40)는 원하는 크기를 가질 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 제 1 부착 지점(34a)과 제 2 부착 지점(34b)의 사이에 형성된 각도(40)의 원하는 크기는 약 120° 내지 약 150°의 범위일 수 있다. 이러한 양상에서, 도 3에서 도시된 바와 같이, 제 1 부착 지점(34a)과 제 2 부착 지점(34b)의 사이에 형성된 각도(40)는 내강(12)에서 여각(42)을 가질 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 내강(12) 내의 여각(42)은 약 210° 내지 약 240°의 크기를 가질 수 있는 것으로 예상된다.

[0085]

예시적인 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)이 본원에 기재한 바와 같은 적어도 하나의 연장 부분을 포함하는 경우, 제 1 및 제 2 부착 지점(34a)(34b)중 하나 이상은 상기 적어도 하나의 연장 부분의 해당하는 연장 부분에 위치할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 상기 적어도 하나의 연장 부분은 두 개의 연장 부분을 포함하고, 제 1 및 제 2 부착 지점(34a)(34b)은 각각의 연장 부분에 위치할 수 있는 것으로 예상된다.

[0086]

선택적으로, 또 다른 양상에서, 개시된 방법은 개체의 심장 내의 삼첨 AV 판막을 재생하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 양상에서, 결합있는 판막이 삼첨 판막인 경우, ECM 물질 도관(10)을 이식하는 단계는 우심실내의 3개의 유두근 각각에 ECM 물질 도관의 출구 부분(18)을 고정하는 것을 포함할 수 있다. 추가의 양상에서, ECM 물질 도관(10)을 이식하는 단계는 ECM 물질 도관의 출구 부분(18)을 제 1 부착 지점을 통해 제 1 유두근, 제 2 부착 지점을 통해 제 2 유두근 및 제 3 부착 지점을 통해 제 3 유두근에 고정하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점은 ECM 물질 도관의 출구 부분의 외측 주변을 따라 서로 이격될 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점은 ECM 물질 도관의 출구

부분의 외측 주변을 따라 서로 실질적으로 균일하게 이격될 수 있는 것으로 예상된다. 그러나, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점들의 간격은 유두근들의 본래 해부학적 구조 및 위치에 따라 변화할 수 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, ECM 물질 도관의 수술 주변(the operative circumference)의 40%가 중격 유두근 및 전방 유두근의 사이에 있도록 상기 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점이 서로 이격될 수 있는 경우, 그 ECM 물질 도관의 주변의 30%는 전방 유두근과 후방 유두근의 사이에 있고 그 ECM 물질 도관의 주변의 30%는 후방 유두근과 중격 유두근의 사이에 있는 것으로 예상된다. 예시적인 양상에서, ECM 물질 도관(10)의 출구 부분(18)이 본원에 기재한 바와 같은 적어도 하나의 연장부분을 포함하는 경우, 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점 중 하나 이상은 상기 적어도 하나의 연장 부분의 해당하는 연장 부분에 위치할 수 있는 것으로 예상된다. 이러한 양상에서, 상기 적어도 하나의 연장 부분은 세 개의 연장 부분을 포함할 수 있고, 상기 제 1, 제 2 및 제 3 부착 지점은 각각의 연장 부분에 위치할 수 있는 것으로 예상된다.

[0087] ECM 물질 도관(10)이 판막륜 영역 및 유두근에 적절히 고정된 후, 그리고 ECM 물질 도관의 임의의 필요한 정돈(trimming) 및 조각(sculpting)이 완료된 후, 개체의 심장의 심방이 닫히고 개체의 심장이 재개될 수 있다.

[0088] 본원에 개시한 바와 같은 ECM 물질 도관의 이식 후, ECM 물질 도관에는 개체 유래의 세포가 거주하여, 적당히 작용하는 자연 심장 판막 조직과 동일하거나 실질적으로 동일한 심장 판막 조직으로 ECM 물질 도관의 ECM 물질을 점진적으로 재구성하게 되는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질 도관이 개체의 심장 내의 판막륜 영역 및 유두근에 부착되는 지점으로부터 ECM 물질 도관으로 줄기 세포가 이동할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 상피 및 내피 전구 세포의 순환 동안, ECM 물질 도관의 표면은 상피 및/또는 내피 전구 세포로 급속히 라이닝되거나 덮여질 수 있는 것으로 예상된다. 또한, ECM 물질 도관이 유두근 및 판막륜 영역에 부착되는 지점은 적당히 작용하는 자연 소엽(leaflet) 조직 및 적당히 작용하는 자연 건삭과 동일하거나 실질적으로 동일한 소엽 조직 또는 건삭으로의 ECM 물질의 재구성을 지시하는 강제 지점으로 작용할 수 있는 것으로 예상된다. 또한, 판막륜이 ECM 물질 도관의 부착 전에 판막륜 영역으로부터 제거되는 경우, ECM 물질 도관의 입구 부분은 적당히 작용하는 자연 판막륜과 동일하거나 실질적으로 동일한 판막륜의 재구성을 지시할 수 있는 것으로 예상된다.

[0089] 실시예

[0090] 하기의 실시예들은 본원에 청구한 화합물, 조성물, 제품, 장치 및/또는 방법이 어떻게 제조되고 평가되는지를 당업자에게 완전히 개시 및 설명하기 위해 기재되는 것으로서, 오로지 본 발명을 예시하기 하는데 목적이 있고 본 발명자들이 이들의 발명이라 여기는 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 수치(예, 양, 온도 등)에 대하여 정확성을 확보하고자 노력하였으나, 약간의 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 나타내지 않는 경우, 부(part)는 중량부이고, 온도는 °C이거나 주위 온도이고, 압력은 상압이거나 상압 근처이다.

[0091] 실시예 1

[0092] 도 4 및 하기 표 1에서 나타낸 바와 같은 돼지 및 인간 판막에 대한 예시적인 판막 치수를 측정했다. 이러한 측정치는 30 mm 판관 직경 및 약 32~35 mm의 길이를 갖는 ECM 물질 도관을 사용할 것을 나타냈다. 또한, 이러한 디자인 기준은 중격 유두근과 전방 유두근 사이의 주변의 40%, 전방 유두근과 후방 유두근 사이의 주변의 30% 및 후방 유두근과 중격 유두근 사이의 주변의 30%를 달성하도록 원위 판막이 이식되어야 함을 나타냈다.

표 1

	소엽	돼지	인간
중량(g)		376 ± 188	380 ± 180
판막륜 길이(mm)	전방	46.57 ± 8.53	40.00 ± 6.71
	중격	39.15 ± 9.00	32.04 ± 5.71
	후방	34.21 ± 7.55	28.94 ± 5.40
두께(mm)	전방	0.390 ± 0.102	0.396 ± 0.151
	중격	0.378 ± 0.106	0.380 ± 0.086
	후방	0.379 ± 0.105	0.413 ± 0.079
교련부 높이(mm)	전방	7.80 ± 2.02	11.16 ± 3.49
	중격	6.73 ± 1.58	13.36 ± 2.19
	후방	6.59 ± 1.36	13.25 ± 2.22
소엽 최대 높이(mm)	전방	19.93 ± 3.53	24.96 ± 3.12
	중격	18.82 ± 3.22	21.54 ± 5.31
	후방	18.62 ± 4.08	21.40 ± 2.60

[0094] 실시예 2

[0095] 예시적인 ECM 물질 도관의 시험관내 혈액동력학적 평가를 생리학 적 우심장 모의기(simulator)에서 수행했다. 그 연구 결과, 30 mm 직경 및 35 mm 길이의 판막 구조물을 이식하여 유두근 부착을 실시하여 그 주변의 40%가 중격 근육 유두근과 전방 유두근의 사이에 있고, 30%가 전방 유두근과 후방 유두근의 사이에 있고 30%가 후방 유두근과 중격 유두근의 사이에 있도록 한 경우, 그 판막은 낮은 경판막(transvalvular) 압력차 및 닫힘 체적으로 역류없이 열리고 닫힌 것으로 확인되었다. 상기 시험관내 흐름 루프에서 닫힌 판막의 이미지가 도 5에서 도시되어 있다. 이들 연구 결과, 상기 판막이 생리학 적 조건하에서 작용한 것으로 확인되었다.

[0096] 또한, 삼첨 판막 봉합부(n=8)에 대한 시험관내 기계적 평가를 수행했고, 봉합부에 대한 최대 인장 파단력은 52.1 ± 14.1 N(11.7 ± 3.16 lbf)이고, 최소치 및 최대치는 각각 34.8 N(7.82 lbf) 및 72.3 N(16.25 lbf)인 것으로 확인되었다. 4겹 ECM 도관에 대한 인장력, 볼 파열력(ball burst) 및 봉합부 고정력(suture pull-out force)은 각각 19.35 ± 5.51 N(4.35 ± 1.24 lbf), 126.6 ± 30.2 N(6699 ± 1598 mmHg) 및 11.12 ± 2.08 N(2.50 ± 0.47 lbf)인 것으로 확인되었다. 이러한 값들은 우측 심장의 저압 환경에서 이러한 판막에 대한 힘 요건을 만족시키기에 충분한 것 이상이다.

[0097] 실시예 3

[0098] 양 모델을 이용한 비-GLP 연구에서, 네 마리 양의 삼첨 판막을 본원에 기재한 바와 같은 2겹 ECM 판막 도관으로 교체했다. 그 과정은 4 마리 동물 모두에 대하여 성공적으로 종료되었다. 그 동물들은 모두 이식 후 3, 5, 8 및 12 개월째에 안락사시켰다. 4 마리 동물 모두에 대한 심장 초음파 검사 결과(표 2), 소엽의 이동 및 기능이 정상으로 보이고, 봉합후 판막을 통한 약한 수준의 역류만이 있는 것으로 확인되었다. 그 판막은 약간의 역류가 있는 정상적인 전향 흐름(forward flow)을 받은 것으로 확인되었다. 부검 결과, 상기 대체 판막은 대체적으로 정상 범위내에 있었고, 12 개월째에 소엽은 재구성되었고 자연 판막 조직과 유사한 것으로 확인되었다.

표 2

[0099]

동물 번호/이식 일자	평가 시점(주)	역류	주
2948(01/13/11)	0	약함	소엽의 이동성 및 기능은 정상으로 보인다. 소엽 접합은 충분한 것으로 보이고 판막륜은 형태학적으로 정상으로 보인다. 약한 내지는 경미한 역류가 있는 정상 전향 흐름.
	1	약함	
	4	약함	
	12	약함	
2981(02/14/11)	0	약함	소엽의 이동성 및 기능은 정상으로 보인다. 소엽 접합은 충분한 것으로 보이고 판막륜은 형태학적으로 정상으로 보인다. 약한 역류가 있는 정상 전향 흐름.
	1	약함	
	4	약함	
	20	약함 내지 중간	
2969(03/10/11)	0	약함	소엽의 이동성 및 기능은 정상으로 보인다. 소엽 접합은 충분한 것으로 보이고 판막륜은 형태학적으로 정상으로 보인다. 역류가 약하거나 없는 정상 전향 흐름.
	20	없음	
	24	약함	
	32	약함	
2966(02/10/11)	0	없음	소엽의 이동성 및 기능은 정상으로 보인다. 소엽 접합은 충분한 것으로 보이고 판막륜은 형태학적으로 정상으로 보인다. 1주일 시점을 제외하고, 역류가 없는 정상 전향 흐름.
	1	약함	
	4	없음	
	24	없음	
	32	없음	
	40	없음	
	48	없음	

[0100] 상기 대체 판막들은 교체된 자연 판막과 대체적으로 유사한 것으로 보였다. 도 7은 ECM 물질 도관이 이식된 양으로부터 얻은 3, 5, 8 및 12개월째의 외식편(explant)을 도시한다.

[0101] 심장 초음파 검사 결과는 판막이 12 개월까지 양호한 혈액동력학적 특성을 가졌다는 것을 나타냈다. 상기 동물들 중 몇몇은 심장 초음파 검사 기술자가 "약함" 또는 "약함 내지 중간"이라고 기록한 바와 같이, 폐쇄 후 판막

을 통해 약한 수준의 역류를 나타냈다. 심장 초음파 검사 결과는 소엽 이탈이 없이 판막의 완전한 접합을 나타냈다(도 6). 이러한 관형 보철 판막에서 외관상 판막 부전의 정도는, 판막이 열리는 때 실린더내에 갇히는 잔류 유체 때문에 심장 초음파 검사 이미지에 과장되어 있다. 이러한 "폐쇄 체적" 유체는, 실제 역류가 존재하지 않는 경우 ECHO상에 역류 체적인 것으로 보이는 것으로, 판막 폐쇄시 역행하여 배출될 수 있다.

[0102] 도 7은 폐쇄된 상태의 우심방에서 바라본 판막의 이미지를 도시하는 것으로, 시간이 경과함에 따라 양에서 점진적인 재구성(再構性)이 일어난다는 것을 보여준다. 3개월 시점(도 7(a))에서, 판막륜에서 재구성이 이미 일어났고 소엽으로 연장되어 외관상 정상인 판막 조직을 재생하고 있었다. 12개월째에(도 7(d)), 소엽은 재구성되었고 자연 판막 조직과 유사한 것으로 보였다. 마찬가지로, 도 8에서 도시한 바와 같이, 유두근 부착 지점은 3개월째에 거의 완전히 재구성된다.

[0103] Movat Pentachrome 염료가 염색된 CorMatrix ECM 삼첨 판막의 이식 후 3, 5, 8 및 12 개월째에 양의 조직 분석을 수행했다. 3개월째에, 판막륜에서 엘라스틴의 형성이 이미 확인되었고, 5 개월째에, 유두근 부착 지점에서도 엘라스틴이 발생되고 있었다. 8 개월까지, ECM이 대부분 재흡수되고 숙주 조직으로 재구성되었다. 세포가 판막 도처에 분포했고, 재구성된 조직은 외층에 엘라스틴이 있고 중간에 GAGs가 있는 자연 판막 조직과 유사한 삼층 구조를 형성했다.

[0104] 실시예 4

[0105] 개시된 멸균 및 탈세포화 방법의 예시적인 적용에 있어서는, 선택된 조직을 수집하고 멸균 식염수에서 세척했다. 다음에, 그 선택된 조직을 24 시간 동안 동결했다. 동결한 조직을 5 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이 첨가된 얼음 상의 차가운 저장 트리스 완충액에서 해동했다. 다음에, 본원에 기재된 바와 같이, 각각의 선택된 조직으로부터 세포의 기질 물질을 분리했다.

[0106] 상기 분리된 세포의 기질 물질을 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)(Lonza Walkersville, Inc.사))에서 5 mM EDTA가 첨가된 0.5-1% Triton X-100/0.5-1% 데옥시콜린산에서 24 내지 48 시간 동안 배양했다. 위점막하층(SS), 소장점막하층(SIS) 및 방광 점막하층(UBS)과 같은 평평한 세포의 기질 물질을 신장된 형태로 배양했다. 수노관, 동맥, 정맥, 관형 SIS와 같은 관형 세포의 기질 물질에는 침적을 통해 그리고 튜브 연동식 펌프의 사용을 통해 상기 용액을 관류했다.

[0107] 배양 후, 각각의 세포의 기질 물질을 DPBS로 3회 세척했다. DPBS를 이용한 각각의 세척은 30분간 계속했다. 다음에, 몇몇의 세포의 기질 물질을, 5 mM EDTA가 첨가된 10-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 RNase/0.2-0.5 $\mu\text{g/mL}$ DNase를 함유하는 등장성 트리스 완충액에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 2 내지 12 시간 동안 배양했다. 이러한 배양 단계 후, 그 세포의 기질 물질을 DPBS로 다시 3회 세척했다. DPBS를 이용한 각각의 세척은 30분간 계속했다. 그 세포의 기질 물질을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관했다.

[0108] 보관 48 이내에, 상기 세포의 기질 물질을, 본원에 개시한 바와 같이 31.1 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 온도 및 1,071 psi 이상의 압력에서 20-60분 동안 초임계 이산화탄소에서 처리했다. 이러한 멸균 단계 후, 그 세포의 기질 물질을 1 분 19 초 동안 2.7 MPa/10 초 (391.6 psi/ 10 초)의 속도로 급속 감압했다. 이때, 세포의 기질 물질에 인가된 압력은 9.9 MPa에서 0.69 MPa로 급속히 감소했다.

[0109] 다음에, 상기 세포의 기질 물질을, 본원에 개시한 바와 같이 30 분 내지 6 시간 동안 초임계 이산화탄소 및 과아세트산(PAA)에서 처리하여 사후 멸균을 달성했다. 이러한 처리 단계에서, 세포의 기질에 인가된 압력은 9.9 MPa로 증가했다. 다음에, 얻어지는 멸균된 무세포성 세포의 기질 물질을 Tyvek®(E.I. du Pont de Nemours & Company사) 파우치(pouch)에 포장하고, 이를 유체 누출을 방지하기 위하여 플라스틱 파우치내에 밀봉했다.

[0110] 하기 표 3은 돼지 수노관, 소 심낭 및 돼지 중피 조직의 멸균 및 탈세포화를 요약하고 있다.

표 3

[0111]

물질	Triton X-100 농도	데옥시콜린산 농도	TX-100/데옥시배양	RNase/DNase 배양	초임계 CO ₂ /PAA 시간
돼지 수노관	0.5%	0.5%	24 시간	2 시간	120 분
소 심낭	0.5%	0.5%	24 시간	2 시간	180 분
돼지 중피조직	0.5%	0.5%	24 시간	2 시간	120 분

[0112] 실시예 5

- [0113] ECM 물질 샘플의 DNA 함량을, 여러 멸균 및 탈세포화 기법을 이용한 각각의 ECM 물질 샘플의 탈세포화의 지표로서 측정하였다. 측정된 DNA 함량은 피코 그린 분석법(pico green assay)을 이용하여, DNA를 분광광도계로 검출되는 형광 표지로 표시하여 평가했다. 측정된 DNA 함량은 시료의 건조 중량에 의해 표준화했다. DNA 함량은 하기의 처리군에 대하여 측정 및 평가했다: (1) 동결건조된 비멸균 SIS; (2) 산화 에틸렌(EtO)-멸균 SIS; (3) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 60분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; (4) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 20분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; 및 (5) 원료 상태의 미처리 SIS.
- [0114] 도 9는 건조 중량에 의해 표준화된 각각의 샘플에 대한 전체 DNA 함량을 도시한다. 도 10은 원료 상태의 미처리 SIS와 비교하여, 각각의 샘플로부터 제거된 DNA의 %를 나타낸다. 이러한 결과는 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 60 분 처리에 의해 비멸균 SIS를 멸균함으로써, 미처리 SIS에서 확인된 DNA의 96% 이상이 제거된 반면, SIS가 EtO로 멸균된 경우 겨우 94%, SIS가 어느 방법으로도 멸균되지 않은 경우 겨우 93% 제거되었다는 것을 나타냈다.
- [0115] 실시예 6
- [0116] 수뇨관을 온화한 세제(DPBS중의 5mM EDTA에서 0.5% Triton X-100/0.5% 테옥시콜린산나트륨)로 24 시간 처리한 다음, 본원에 기재한 바와 같이 DPBS에서 3회 세척했다. 이러한 전처리 후, 상기 수뇨관을 본원에 개시한 바와 같이 급속 감압 및 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 처리를 통해 탈세포화 및 멸균했다. 하기의 처리 단계에서 하나의 샘플 수뇨관에 대한 헤마톡실린&이오신(H&E) 염료를 준비했다: (A) 천연 수뇨관; (B) 전처리된 수뇨관; 및 (C) 본원에 개시한 바와 같이 급속 감압 및 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 처리를 받은 전처리된 수뇨관. 이러한 염색 결과, DNA 함량은 급속 감압에 의해 유의하게 감소된 것으로 확인되었다.
- [0117] 실시예 7
- [0118] ECM 물질 샘플의 성장 인자 함량을 측정했다. ECM 물질 샘플에 대한 효소 결합 면역분석(ELISA)을 수행하여 각각의 샘플에서 TGF- β 의 활성 형태 및 bFGF의 함량을 정량했다. 하기의 처리군들이 평가되었다: (1) 동결건조된 비멸균 SIS; (2) 산화 에틸렌(EtO)-멸균 SIS; (3) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 60분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; (4) 본원에 개시한 바와 같이 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 20분 처리를 통해 멸균되는 동결건조된 비멸균 SIS; 및 (5) 원료 상태의 미처리 SIS. bFGF 함량 및 TGF- β 함량의 측정치는 각각의 샘플의 건조 중량에 의해 표준화했다. 그 결과가 도 11 및 도 12에서 보여진다. 이들 결과는 두 성장 인자의 농도가 EtO에의 노출에 의해 감소되었다는 것을 나타냈다. 그러나, 그 성장 인자들의 농도는 PAA 및 초임계 CO₂를 이용한 멸균에 영향받지 않았다.
- [0119] 실시예 8
- [0120] 본원에 개시한 방법을 이용하여, 주요 멸균제로서 그리고 SIS 시트에 bFGF를 첨가하기 위한 운반체로서 초임계 CO₂를 이용했다. 우선, 각각의 SIS 시트를 다양한 양의 bFGF와 함께 Tyvek® 파우치내로 위치시켰다. 상기 파우치를 9.6 MPa에서 60 분간 초임계 CO₂에 노출시켰다. 그 파우치를 7.20 MPa/min의 속도로 급속 감압했다. 샘플을 초임계 CO₂내의 16 mL PAA에서 직접 20분간 처리했다. 하기의 처리 군들이 평가되었다: (1) bFGF 첨가 없음; (2) 5 μ L의 bFGF 첨가; 및 (3) 15 μ L의 bFGF 첨가. 각각의 μ L의 bFGF는 0.1 μ L의 bFGF를 함유했다. 따라서, 각각의 SIS 시트는 약 0.5 g으로 칭량되었기 때문에, 5 μ L 및 15 μ L 군에 대한 bFGF의 최대 농도는 각각 약 4170 pg/mg 건조 중량 및 약 12,500 pg/mg 건조 중량이었다. 이러한 군에 대한 bFGF 함량은 각각의 샘플의 건조 중량에 대하여 측정된 것으로, 도 13에서 보여진다. 이들 결과는 bFGF의 측정된 농도가 최대 농도에 도달하지 않았고, 15 μ L의 bFGF가 첨가된 샘플은 5 μ L의 bFGF가 첨가된 샘플에서 측정된 bFGF의 농도보다 3배 더 큰 bFGF 측정 농도를 갖지 않았다는 것을 나타냈다.
- [0121] 실시예 9
- [0122] 두 겹(two-ply) SIS 샘플의 인장 강도를 측정했다. 하기의 처리 군들이 평가되었다: (1) EtO 처리; (2) 20분간 PAA/초임계 CO₂ 처리; (3) 60분간 PAA/초임계 CO₂ 처리; 및 (4) 120분간 PAA/초임계 CO₂ 처리. 인장 강도 시험 결과가 도 14에서 보여진다. 이들 결과는 본원에서 개시한 바와 같이 PAA/초임계 CO₂로 20 분 또는 120 분간 처

리된 SIS 샘플이 EtO로 처리된 샘플과 비교하여 유의하게 강했다는 것을 나타냈다.

[0123] 실시예 10

[0124] 하기 표 4에 나타난 농도에서 및 시간 동안 표 4에 나타난 ECM 물질의 관류 또는 온화한 세제 침적 후 급속 감압을 사용했다. 조직을 수확하여 식염수에 세척했다. 그 조직을 적어도 24 시간 동안 동결했다. 그 조직을 5 mM EDTA가 첨가된 얼음 상의 차가운 트리스 완충액에서 해동했다. 원하는 ECM을 분리했다. 평평한 조직(예, 위 점막하층, 소장 점막하층, 및 방광 점막하층)의 경우, 그 조직을 조직 신장 기기상에서 신장시키고 신장 상태로 용액 상태로 배양했다. 관형 조직(예, 수뇨관, 동맥, 정맥 및 관형 SIS)의 경우, 그 조직에 튜브 연동식 펌프를 이용하여 용액을 관류하고 배양동안 침적했다. 그 조직을 DPBS에서 5 mM EDTA가 첨가된 0.5% Triton X-100/0.5% 테옥시콜린산에서 2 내지 24 시간 동안 배양했다. 그 조직을 DPBS에서 각각 15 내지 30분씩 3회 세척했다. 그 조직을 4 °C에서 보관했다. 조직 보관 48 시간 이내에, 그 조직을 초임계 CO₂에서 20 내지 120 분간 처리한 후, 급속 감압(RDP)(1 분 19초 이내에 9.9 MPa에서 0.69 MPa로 압력 감소, 2.7 MPa/10sec의 감압에 해당)했다.

표 4

[0125]

물질	Triton X-100 농도	테옥시콜린산 농도	TX-100/테옥시 배양	초임계 CO ₂ 시간
돼지 수뇨관	0.5%	0.5%	24 시간	60 분
소 심낭	0.5%	0.5%	24 시간	60 분
돼지 중피 조직	0.5%	0.5%	2 시간	60 분
SIS	0.5%	0.5%	2 시간	60 분

[0126] 그 결과, 초임계 CO₂ 노출 및 그 이후의 급속 감압(SCCO₂+RDP)은 ECM에서 성장 인자를 보존하면서 세포 찌꺼기 및 DNA 제거를 촉진한 것으로 확인되었다.

[0127] 실시예 11

[0128] 여러 ECM 조성물의 성장 인자 함량을 대표적인 성장 인자인 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)를 이용하여 측정했다. bFGF는 천연 ECM 조직에서 우세한 성장 인자이기 때문에 선택되었다. 효소 결합 면역 분석(ELISA, R&D Systems사, Minneapolis, MN)를 이용하여 하기의 샘플에서 bFGF 함량을 측정했다: (1) 미처리(원료상태) SIS; (2) 세제 침적(TX-deoxy) 후의 SIS; (3) TX-deoxy 및 RDP (SCCO₂ 포함)후의 SIS; (4)TX-deoxy, RDP 및 PAA (멸균의 경우 PAA와 함께 SCCO₂)후의 SIS; (5) TX-deoxy 및 PAA후의 SIS; (6) EtO(Cook Biotech, Inc.사 공급)에 의해 멸균된 SIS; 및 (7) 비멸균 SIS (Cook Biotech, Inc.사 공급).

[0129] 이러한 연구에서는, SIS를 이용하여, RDP로 처리되거나 처리되지 않은 ECM 조성물을, Cook Biotech, Inc사가 제공한 SIS와 비교했다. 처리된 SIS 중 일부는 탈세포화 후 기재된 SCCO₂ + PAA 방법을 이용하여 멸균했다. 각각의 ECM 조성물의 측정된 성장 인자 함량이 도 15에서 보여진다.

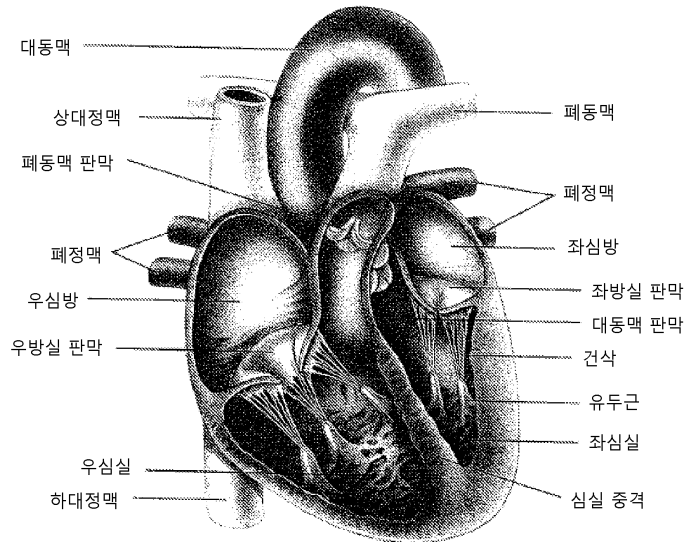
[0130] 그 결과, 상기 급속 감압 과정은 bFGF 함량을 보존하는데 있어서 다른 탈세포화 과정들보다 더욱 효과적이었고, 잔류 DNA 및 세포 단편을 제거하기 위한 추가의 RDP 처리 과정은 bFGF의 작은 손실만을 초래한다는 것을 확인했다. 비교로, PAA 멸균 과정은 RDP가 없는 경우에도 잔류 bFGF의 거의 전부를 제거하는 것으로 보였다. 게다가, 급속 감압 과정은 Cook 탈세포화 방법과 비교하여 천연 SIS의 bFGF 함량을 더욱 많이 보존했다. 이러한 결과의 취지에서, bFGF 함량이 감소된 경우, 다른 성장 인자들이 모두 ECM 조성물에 결합되기 때문에 마찬가지로 그 성장 인자의 함량이 모두 감소하는 것으로 판단된다.

[0131] 본 출원에서는 여러 간행물들이 참조된다. 이러한 간행물들의 개시내용은 본 발명이 속하는 기술 분야의 상태를 더욱 충분히 설명하기 위하여 본원에 참조로 포함된다.

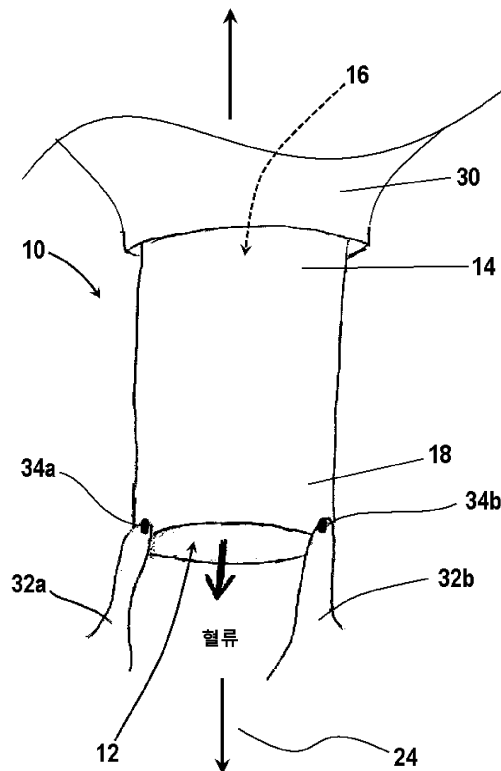
[0132] 본 발명의 범위 및 정신을 벗어나지 않고 여러 변경 및 변화가 본 발명에서 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백하게 된다. 본원에 개시한 본 발명의 명세서 및 실시를 고려하면 본 발명의 다른 실시예들이 당업자에게 명백하게 된다. 본 명세서 및 실시예들은 오로지 예시적인 것으로 해석되어야 하고, 본 발명의 진정한 범위 및 정신은 하기의 특허청구범위에 의해 나타내어 진다.

도면

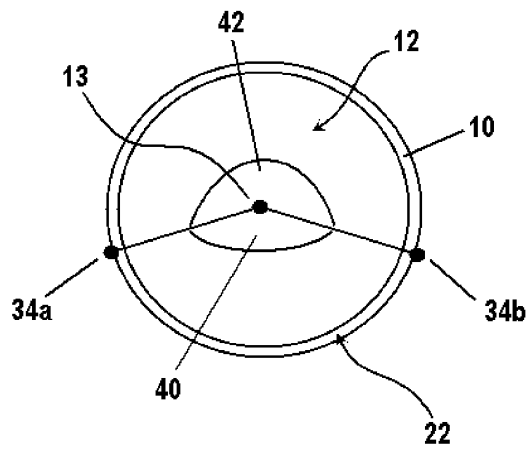
도면1



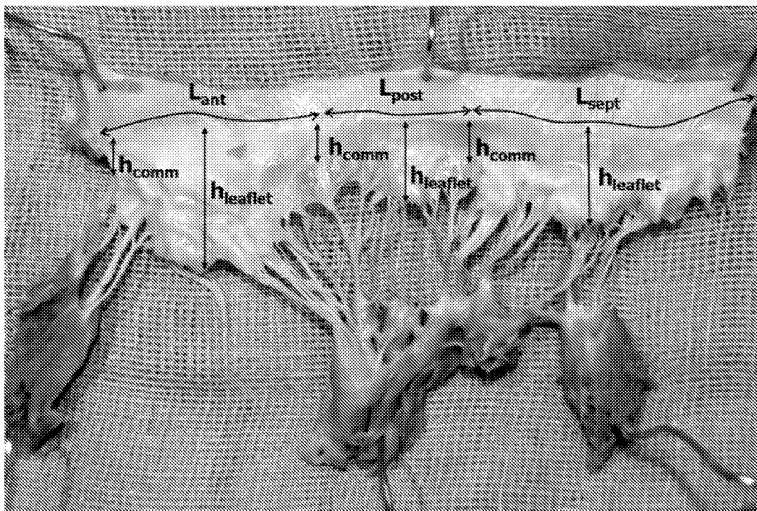
도면2



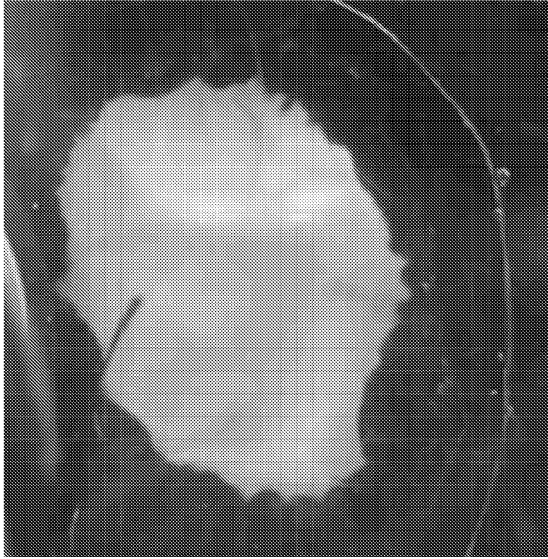
도면3



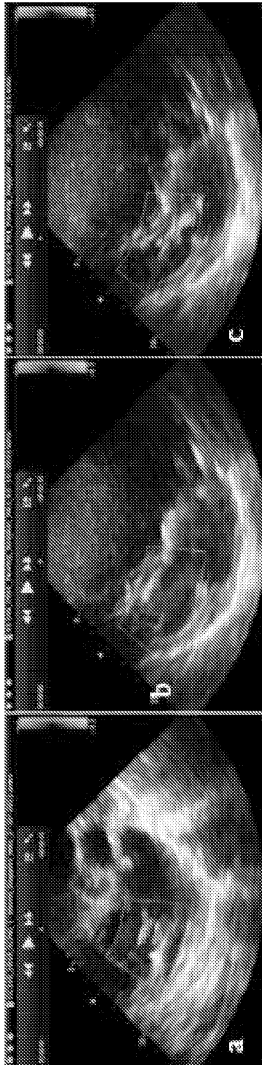
도면4



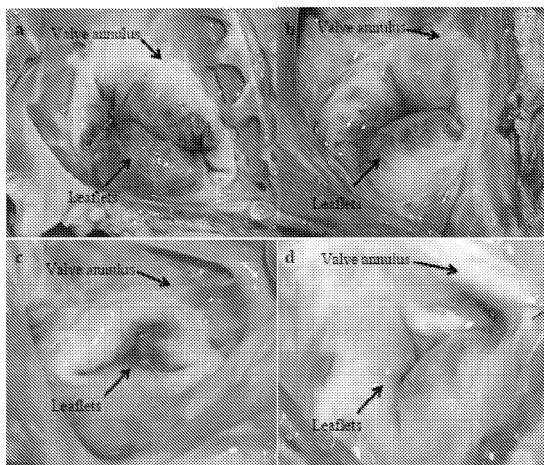
도면5



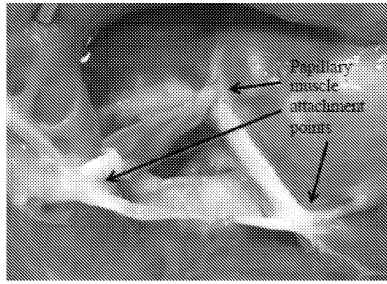
도면6



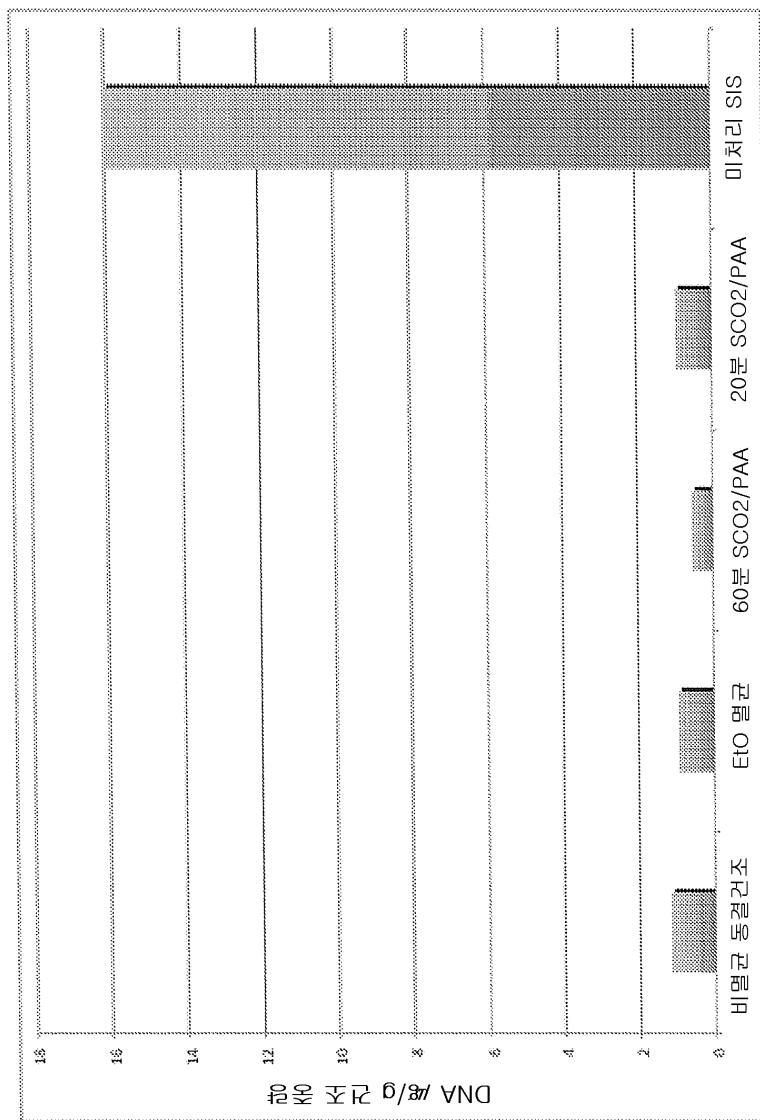
도면7



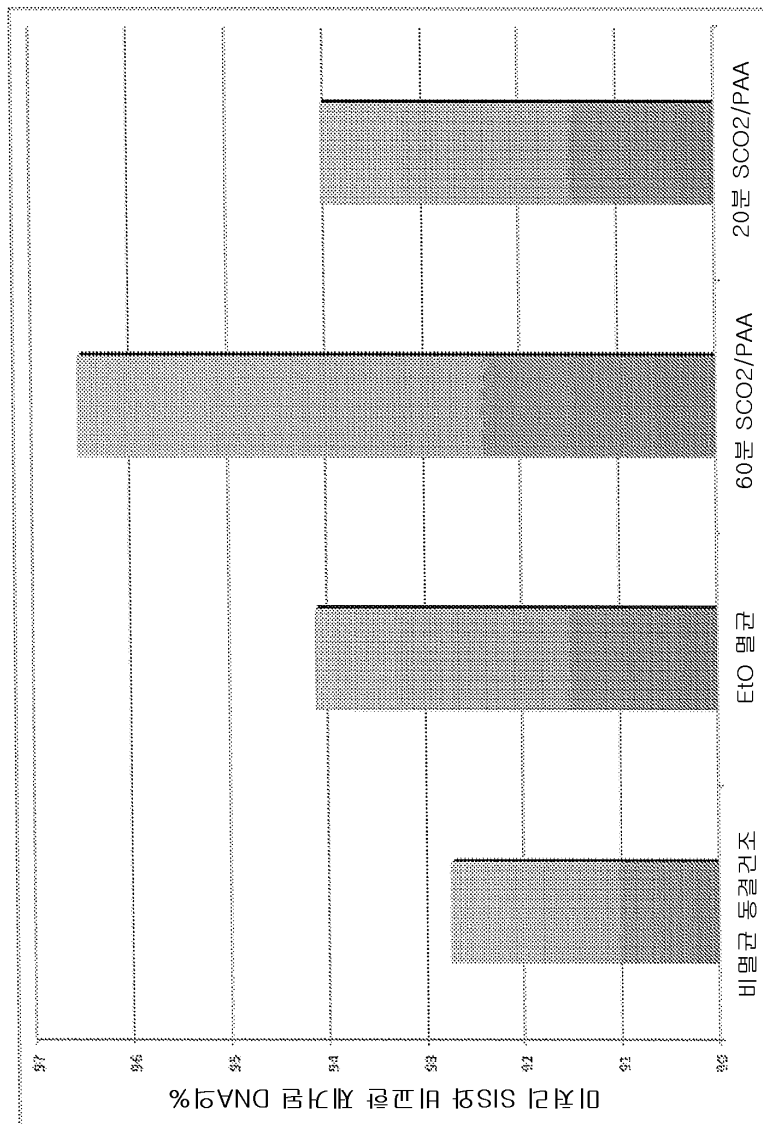
도면8



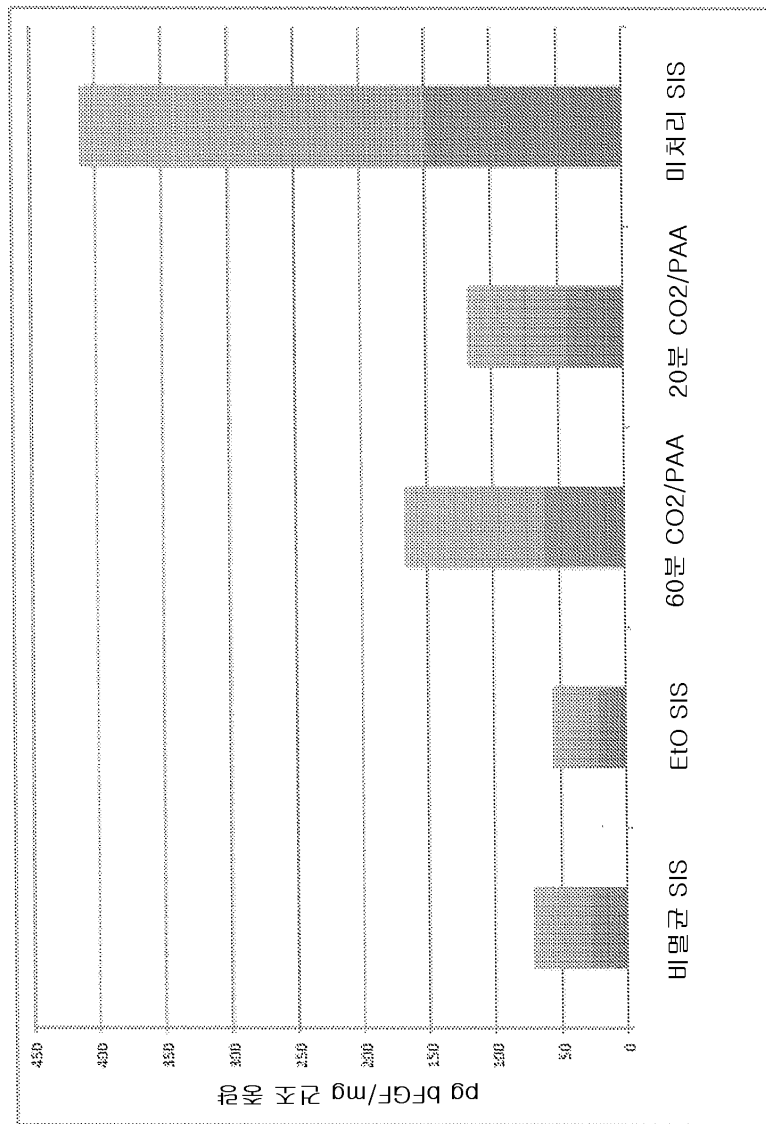
도면9



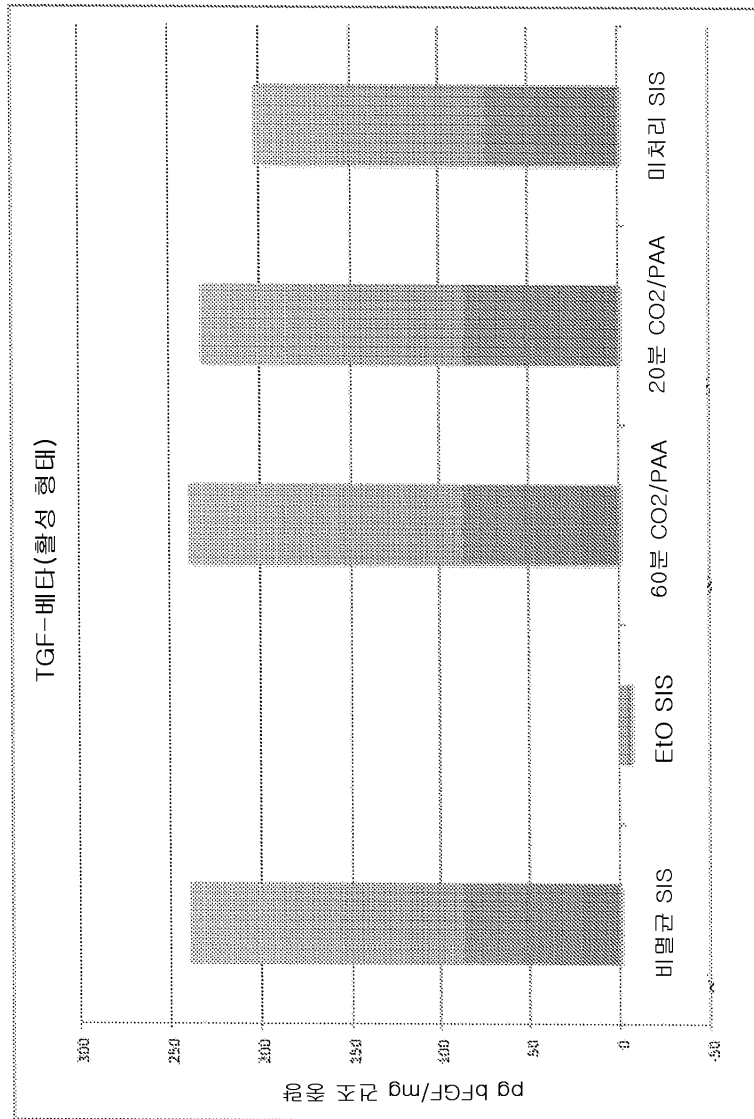
도면10



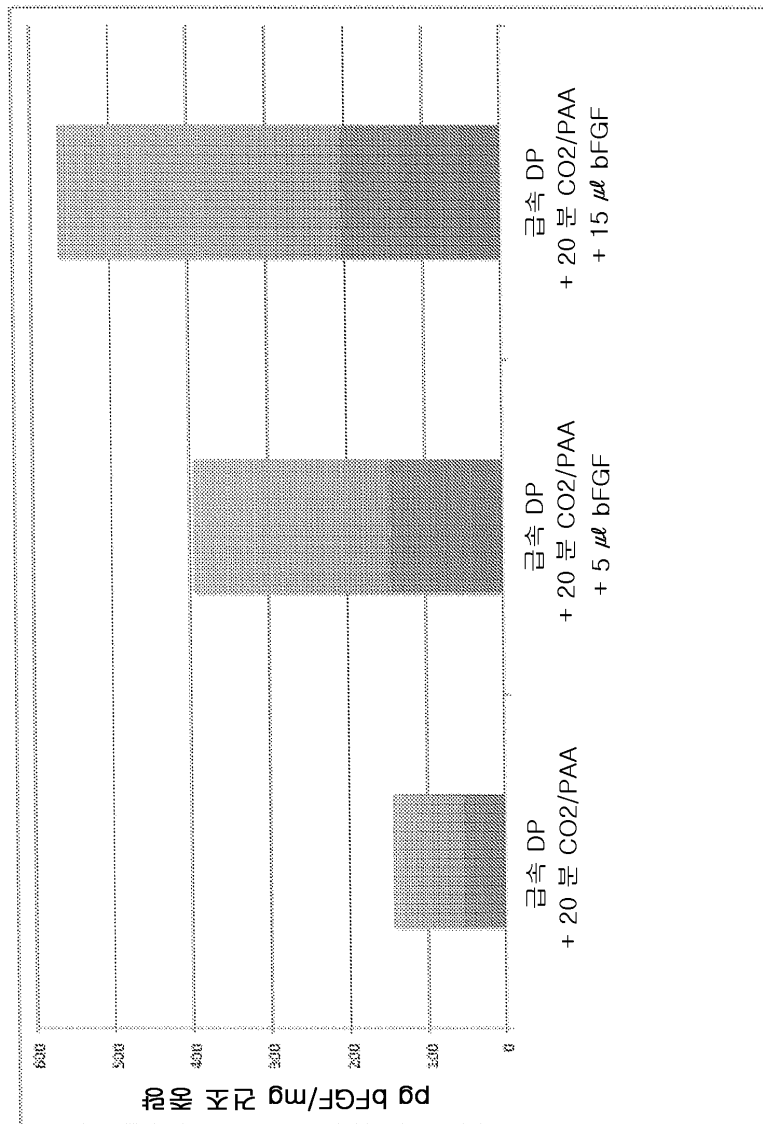
도면11



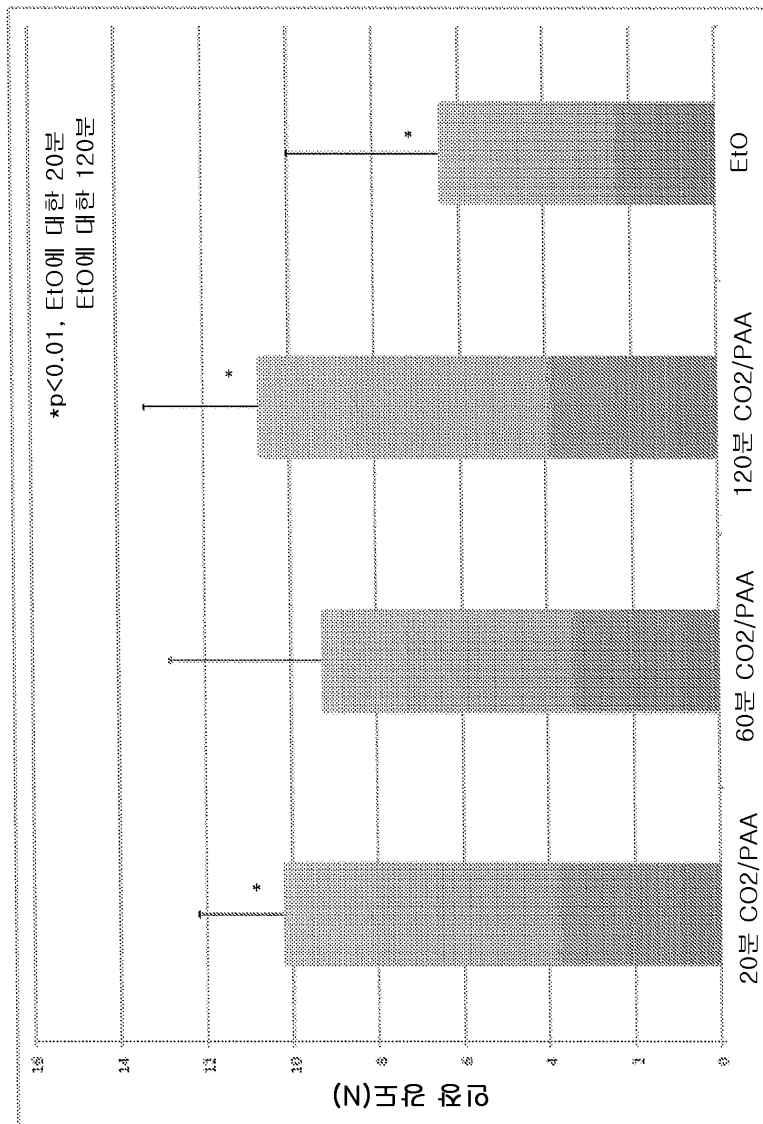
도면12



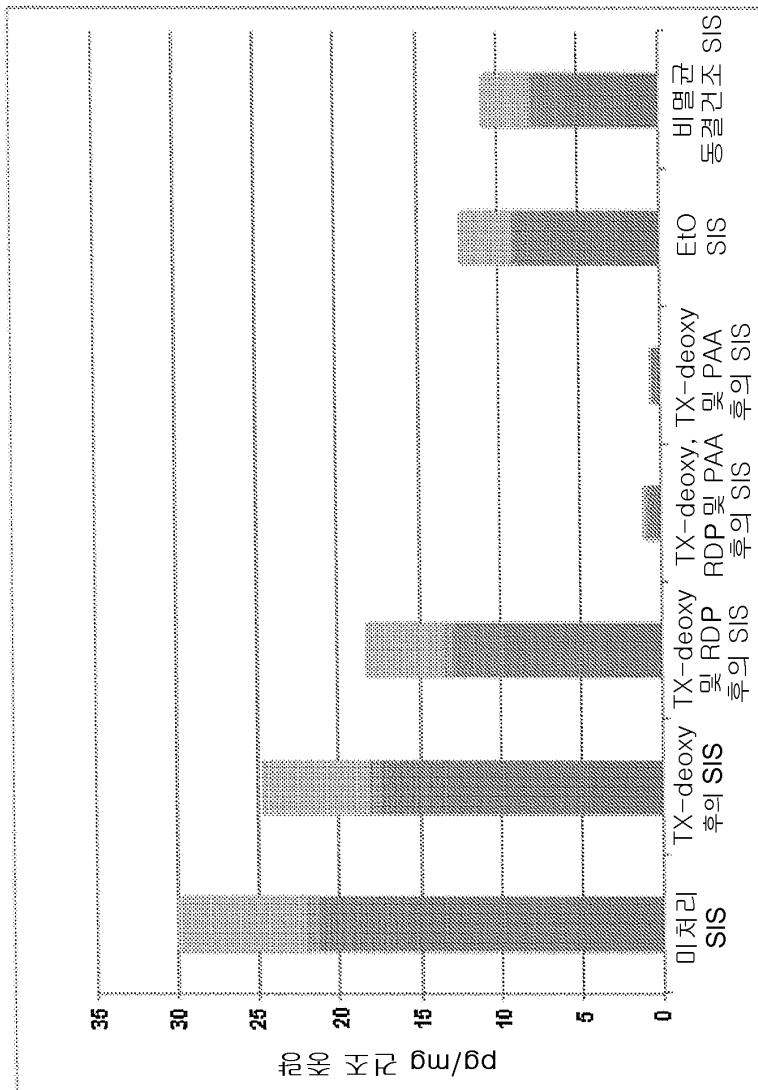
도면13



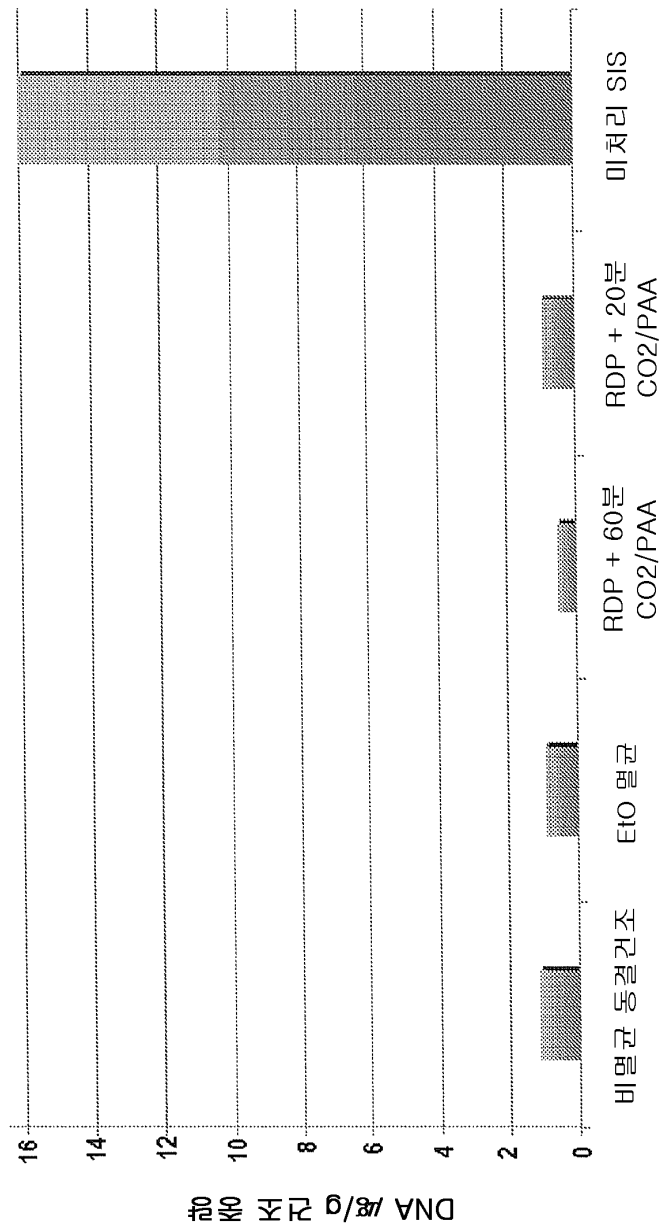
도면14



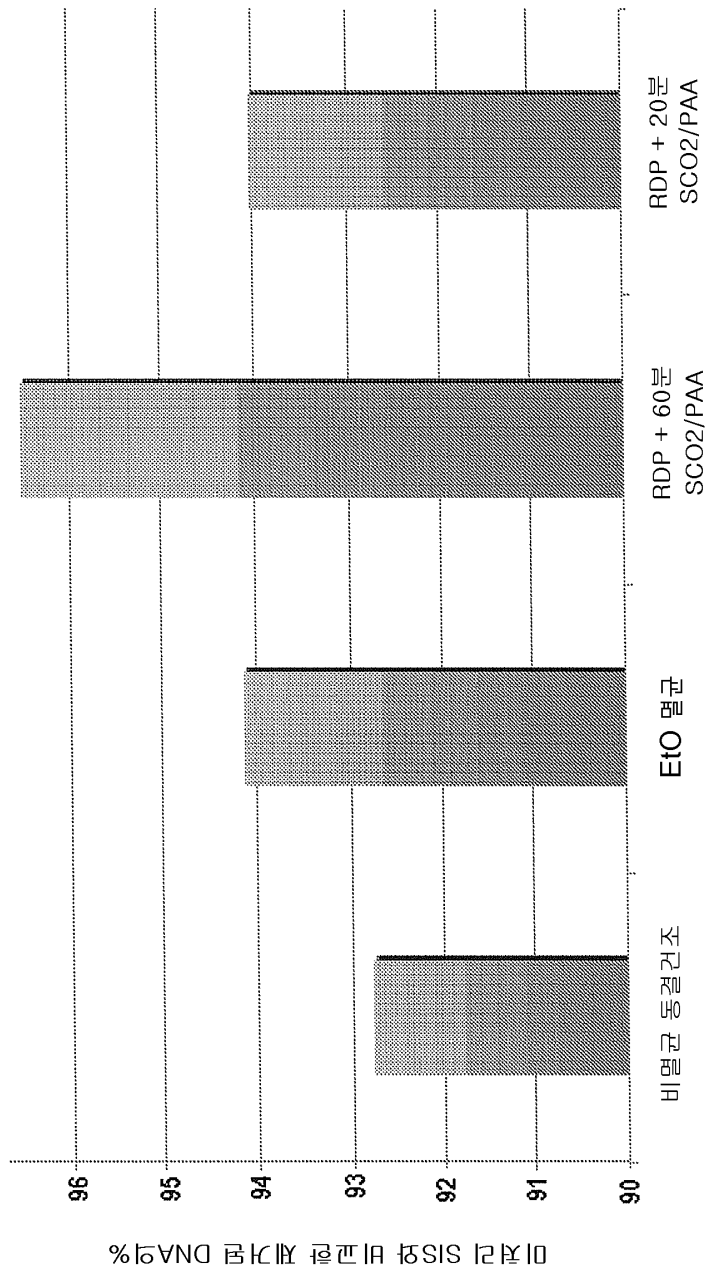
도면15



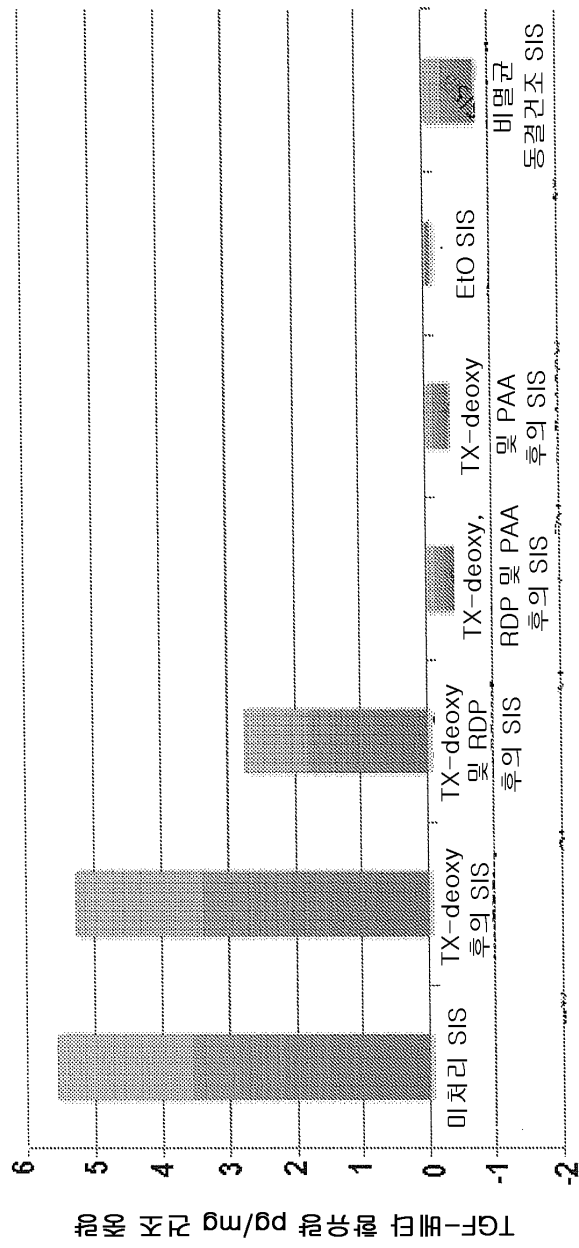
도면16



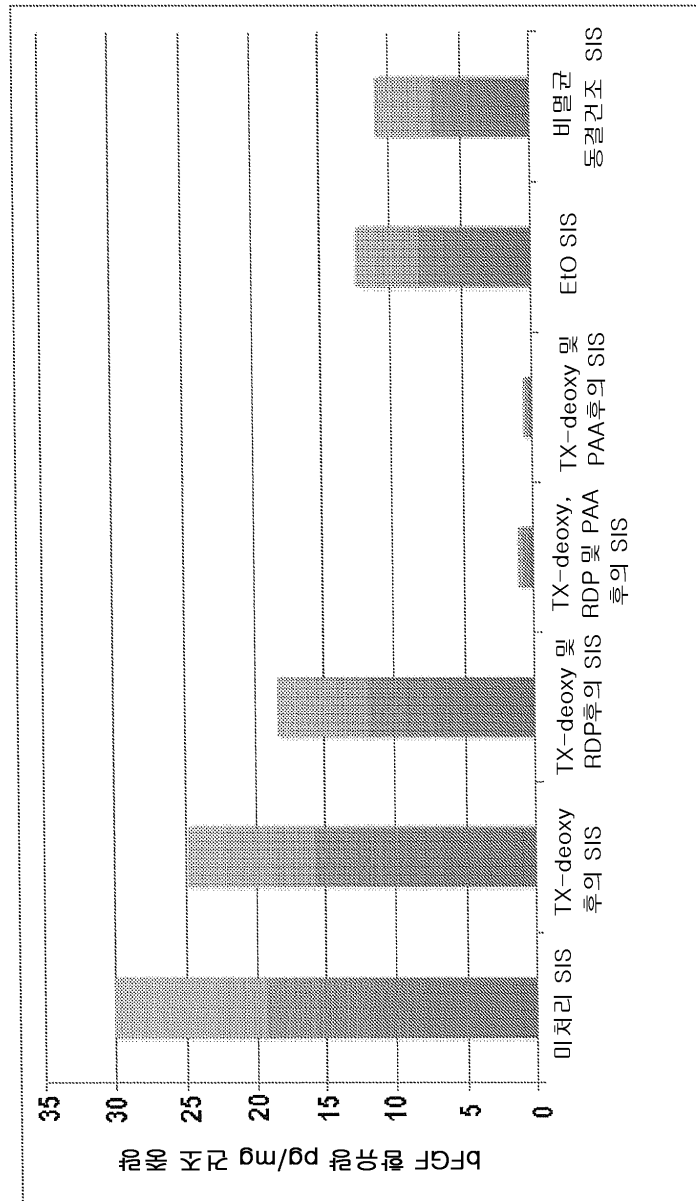
도면17



도면18



도면19



도면20

