(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61F 2/24

(45) 공고일자 2004년08월25일
(11) 등록번호 10-0365573
(24) 등록일자 2002년12월09일

(21) 출원번호	10-1996-0705072	(65) 공개번호	10-1997-0701523
(22) 출원일자	1996년09월13일	(43) 공개일자	1997년04월12일
번역문제출일자	1996년09월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/002350	(87) 국제공개번호	WO 1995/24873
(86) 국제출원일자	1995년02월27일	(87) 국제공개일자	1995년09월21일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 라트비아 몽고 마다가스카르 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 우즈베키스탄 베트남 에스토니아 그루지야 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 케냐 EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 아르메니아 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투칼 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		

(30) 우선권주장 08/213,754 1994년03월14일 미국(US)

(73) 특허권자 크라이어라이프, 인크.
미합중국 조오지아 (우편번호 30144) 케네소 로버츠 블러바드 1655 앤더블유
(72) 발명자 스티븐 골드스타인
미국, 조지아 30345, 애틀랜타, 그린브룩 웨이 2939
(74) 대리인 김영희, 나영환, 이상섭

심사관 : 이순국

(54) 이식용처리조직및이의제조방법

명세서

기술분야

<1> 다양한 합성 이식편 및 인공 장기가 개발되어 왔으며, 현재 사용되고 있다. 그러나, 이러한 합성 대체물은 색전 합병증을 유발하거나 또는 장기간의 이식 기간 중 소재의 강도가 감소되는 것으로 알려져 있다. 심장 판막과 같은 기계적인 인공 삽입물의 구조적 변형은 이의 장착 특성과 관련하여 개선되어 왔다할지라도, 이러한 변형은 돌발적으로 그리고 경고없이 발생하여 외과적 개입 및 인공의 인공 삽입물 장치의 교체를 요하는 긴급 사태가 발생할 수 있는 판막 기능 부전의 여지가 여전히 있다. 맥관계에 사용된 합성/인공의 인공 삽입물의 표면 특성으로 인해서, 혈소판 부착은 혈전 형성 가능성을 증대시키며, 이식편을 소생시키기 위해서는 항응고 요법을 반드시 제공하여야 하며, 잠재적인 특정 군의 수용체(예를 들면, 출산 가능한 연령의 여성)에게서는 이와 같은 이식편이 부적절하게 된다.

<2> 또다른 예로서, 생체 인공 삽입 심장 판막은 돼지 또는 소의 판막 조직으로 제조된다. 이는 사람과는 면역학적으로 종불일치성을 갖기 때문에, 동종이식편을 유지시킬 수 있는 면역 억제제 요법을 사용함에도 불구하고 이식편 수용체에 의해 급격한 거부 반응을 일으킨다. 이러한 조직은 수용체내에서 외래 세포 표면, 특히 심장 판막 및 혈관의 내피성 내막상에서 항원을 인식하는 이미 형성되어 있는 자연 항체 수용체의 존재로 인해 수용체에 의한 과민성 거부 반응을 일으키게 되는 점이 중요하다. 소 또는 돼지의 판막 조직은 구조적으로 그리고 생체 역학적으로 사람에게 사용하기에 적합한 반면, 이와 같은 외래 조직이 수용체의 면역 거부 반응을 자극하는 가능성은 글루타르알데히드와 같은 화학적 가교제를 사용하는 종래의 치료에 제시되어 있었다. 이러한 조직의 치료는 외래 조직에 대한 수용체의 면역학적 반응 자극을 감소시키며, 또한, 생성된 생존불가능한 판막 조직의 콜라겐 단백질을 안정화시켜 단백질 분해 효소에 의한 분해에 대해 더 큰 내성을 갖게 한다. 그러나, 이러한 조직 이식 조직은 생존불가능하기 때문에, 수용체에게서 조직 수술중에 분해되는 구조 단백질을 복구시키는 생합성 메카니즘이 알려져 있지 않다. 이러한 조직 이식 조직은 시간이 경과됨에 따라 석회화되는 경향이 있고, 구조적 손상 및 그 결과로 생기는 부전증을 일으킬 위험성이 증대된다. 혈전색전증이 기계적 이식과 비교하여 드물게 발생하지만, 이는 이식 조직 수용체에 대한 환자 관리상의 문제점이 되고 있다.

<3> 마찬가지로, 신장과 같은 장기는 장기 거부 반응을 일으키는 이식편 수용체에게 면역학적 매개 반응을 최소화하기 위한 노력으로 형제 자매중 한 사람으로부터 다른 형제 자매에게 동종이계적으로 이식되어 왔다. 이와 같은 환자뿐 아니라, 형제 자매 이외의 다른 기증자로부터 이식 장기를 기증받은 환자에게도 면역계를 억제시키도록 약제를 자주 투여하여야 한다. 이식 조직 또는 장기에 대한 면역학적 반응은 거부 반응을 최소화하도록 면역억제제를 사용하여 억제시킬 수 있으며, 성격상 면역억제 요법이 일반적이

다. 또한, 면역억제제는 면역 반응을 전반적으로 억제시키는 경향이 있으며, 이는 감염에 대항하는 이식편 수용체의 능력을 저감시킨다.

<4> 최근, 비-사람의 조직의 처리에 의해 사람 또는 포유동물 이식에 대한 개선된 생물성 인공 삽입물을 생성하는 방법이 개시되어 왔다. 예를 들면, 오톤, 이. 크리스토퍼의 미국 특허 제5,192,312호를 참조한다. 오톤의 특허에 의하면, 예를 들면, 돼지 기원의 조직에서 생세포를 제거하고, 성장 인자의 존재하에 새로운 세포를 사용하여 조직을 재개체군화 형성하여 이식 조직을 생성시키는 방법이 개시되어 있다. 재개체군화 형성 세포는 의도한 이식편 수용체와 면역학적으로 적합성을 갖는다. 이러한 방법에 의해 생성된 생이식편은 다른 종래 기술의 생체 인공 삽입물이 갖는 많은 단점을 지니지 않는다.

<5> 발명의 개요

<6> 본 발명은 사람 또는 기타 포유동물의 이식에 적합한 이식 조직을 생성시키는 신규하고 이로운 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 일반적으로 이식시에 수용체에 의해 해로운 면역 반응을 일으키지 않으며, 동종이계 이식 조직의 재생 능력을 지니고, 제한된 석회화 경향을 나타내며, 혈전색전증을 실질적으로 자극하지 않는 생육 가능한 생체 인공 삽입물을 생성하는 이종 또는 동종이계 조직의 처리에 관한 것이다.

<7> 전술한 바에 의하면, 본 발명의 방법은 탈세포화 조직 매트릭스로부터 생세포 및 기타 항원 및 세포 조직파편을 제거하여 추가로 처리 가공하기 위한 이종(또는 동종이계) 조직 매트릭스를 제조하는 단계, 이 매트릭스를 처리하여 새로운 면역학적 부위의 생성을 억제시키는 단계를 포함한다. 그후, 이 조직 매트릭스를 하기 기재된 세포 부착 인자로 처리하여 새로운 세포를 사용하는 조직 매트릭스 재개체군화 형성 방법 중에 매트릭스로의 세포 부착을 강화시킨다.

<8> 천연 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하는데 사용된 세포에 의해서, 종 하이브리드 생체 인공 삽입물의 여러가지 특성, 예를 들면, 이식 부위에서 천연 조직에 대해 비정형이거나 또는 특정 연령 군에 대해 독특한 단백질을 합성시키는 능력을 얻을 수 있다. 하이브리드 이식 조직은 생체 인공 삽입 이식 조직의 구조적 잇점과 동종이계이식 조직의 작용적 및 재생적 가능성을 합하는 것 뿐 아니라, 면역 반응의 감쇠를 나타내거나 또는 면역 반응을 전혀 나타내지 않으면서 제한된 석회화 성향을 나타내고, 혈전색전증을 실질적으로 자극하지 않는다. 현재 사용중인 모든 생체 인공 삽입 이식 조직을 사용하는 경우도 마찬가지로 이러한 변형된 조직은 제한적으로 공급되는 것이 아니라, 더 많은 수용체에게 이식 조직의 기능성을 제공할 수 있다. 또한, 이러한 이식 조직은 반드시 화학적으로 변화되어 수용체의 면역계에 대해 안정하게 되어야 하는 것은 아니다. 그래서 이러한 소재는 교체에 사용되는 조직의 생체역학적 특성과 동일한 생체역학적 특성을 보인다.

<9> 본 발명은 사람 이식에 적합한 생체 인공 삽입 이종이식조직을 생성하는데 유용하다. 특히, 이는 주된 구조 성분이 심장 판막, 특히 돼지 또는 소의 심장 판막과 같은 결합 조직 매트릭스인 이종발생성 이식 조직을 생성하는데 적합하다. 본 발명에 사용하기 적절한 기타 조직의 비제한적 예로는 대동맥 심장 판막, 폐동맥 심장 판막, 대퇴근막, 경막, 심장막, 반월판, 피부, 인대, 건 및 기타 결합 조직 구조 등이 있다.

배경기술

<10> 외과적 심장 판막 교체 수술은 3 가지의 상이한 유형의 인공 삽입물, 즉 인공적(합성물) 삽입물, 생체 인공 삽입물(화학적 고정된 돼지 판막 또는 소의 심장 막) 또는 사람의 동종이계 이식편 중 하나를 이식하는 것과 관련이 있다. 이러한 인공 삽입술은 선천성 기형이거나 또는 대동맥판폐쇄부전증 또는 대동맥 협착증을 야기하는 퇴행성 변화 또는 질환에 의해 손상된 생 대동맥 판막의 교체에 유효한 혈액 동태적인 개선점을 제공한다. 미국에서 매년 시술되는 약 55,000 회의 대동맥판막 이식편중에서 75%가 인공 판막이다. 이의 나머지는 이식 조직에 의한 것이다. 이중에서, 80% 이상은 돼지 생체 인공 삽입이며, 동종이계 이식편(연간 2,500 회)은 상대적으로 소수이기 때문에, 대체로 가능성이 제한되고 있다.

<11> 이상적인 인공 삽입물의 판정 기준으로는 자연적인 혈류역동태, 장기간의 내구성, 혈전색전성 합병증의 발생율이 낮은 것, 석회화가 없는 것, 면역원성이 없다는 입증 및 이식후의 부적절한 과형성 반응이 발생하지 않았다는 확인 등이 있다. 자가 이식의 경우에도, 예를 들면 정맥 이식 조직과 같은 조직의 외과적 시술은 그 자체가 조직 과형성을 자극하게 되어 이식 실패를 야기할 수 있다.

<12> 본 발명에 의하면, 장착, 석회화 경향, 면역 반응 자극 및 입수 곤란성 감소와 관련하여 이로운 특성을 갖는 심장 판막, 폐 판막 및 대동맥 판막을 제조할 수 있다. 또한, 본 발명은 기타 형태의 조직, 특히 구조성 간극 콜라겐에도 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<13> 도 1은 신선한 대동맥 소편의 현미경 사진.

<14> 도 2a는 탈세포화 후의 폐동맥 판막 도관을 나타내는 현미경 사진.

<15> 도 2b는 탈세포화 후의 심근을 나타내는 현미경 사진.

<16> 도 3a는 탈세포화 대동맥 소편의 현미경 사진.

<17> 도 3b는 재개체군화 형성된 대동맥 소편의 현미경 사진.

<18> 도 4는 돼지 대동맥 심장 판막 소편에서의 콜라겐 및 비-콜라겐 단백질 합성.

<19> 도 5는 동결보존 처리되거나 또는 탈개체화 처리된 돼지 심장 판막 소편의 추출물-항체 포획물에 대한 사육된 토끼 항혈청의 반응도

<20> 도 6a는 이식후 탈세포화 돼지 심장 판막 소편에 의해 유발된 최소한의 세포 반응을 나타내는 현

미경 사진.

<21> 도 6b는 이식후 동결보존 처리된 돼지 대동맥 판막 소편에 의해 유발된 세포 반응을 나타내는 현미경 사진.

<22> 도 7a는 돼지 세포와 관련된 항원에 대해 분석한 신선한 돼지 대동맥 판막 소편의 현미경 사진.

<23> 도 7b 는 돼지 세포와 관련된 항원에 대해 분석한 탈세포화 돼지 대동맥 판막 소편의 현미경 사진.

<24> 도 8은 돼지 대동맥 판막 소편의 응력-변형률 관계.

<25> 도 9는 예비 처리후의 돼지 대동맥 소편의 응력 완화 곡선.

<26> 도 10은 돼지 대동맥 판막 소편에 대한 인장 실패 데이타.

발명의 상세한 설명

<27> 의도한 이식편의 유형에 따라 수용체가 사람인 경우, 최초 이식편 조직 또는 장기는 비-사람 기원의 것이 될 수 있다. 이러한 조직 또는 장기는 식용 동물로부터 또는, 조직 또는 장기를 제공할 목적으로 사육된 가축화된 동물군으로부터 공인된 도살장에서 입수할 수 있다. 상기 조직 또는 장기는 멸균 처리, 상기 조직 또는 장기의 임의의 해부의 경우에는 무균 상태하에서 실시한다.

<28> 비-사람 공급원으로부터, 사람 수용체에 사용하고자 하는 이식편 조직을 처리하여 이종이식조직 또는 이종발생성 이식편 조직을 생성시킬 수 있으며, 이는 생세포 및 기타 항원성 성분이 포함하지 않는 비-사람 조직 매트릭스로부터 형성되고, 생육가능한 사람 세포로 개체화될 수 있다. 이와 같은 면역학적으로 내성이 있는 이식편을 생성하는 방법의 단계는 하기에 기재되어 있다.

<29> 이식 조직을 수집하고 해부한 후, 항균제, 예를 들면, 항세균제, 항진균제 또는 이식 조직과 적합성을 갖는 살균제를 포함하는 무균 완충 영양 용액내에서 인큐베이트시키므로써 이식편 조직을 살균시킬 수 있다.

<30> 이어서, 추가의 처리를 위해 살균 이식편 조직을 동결보존 처리시킬 수 있거나 또는 본 방법의 조직 매트릭스 또는 기타 조직 생성물을 차후에 동결보존 처리하는 것을 포함하는 본 방법의 다음 단계에 따라 즉시 추가 처리할 수 있다.

<31> 탈세포화 처리

<32> 본 발명의 예비 단계는 생육가능한 생세포 뿐 아니라, 기타 세포 및 비세포 구조물 또는 이식편 수용체에 의해 해로운 면역 반응을 유도할 수 있는 성분을 제거할 것을 요구한다.

<33> 물리적, 화학적 및 생화학적 방법을 비롯한, 조직 및 장기중의 생세포의 생존가능성을 감소시키는 몇몇의 수단이 공지되어 있다. 본 명세서에 참고로 인용된 미국 특허 제5,192,312호를 참조한다. 이와 같은 방법은 본 명세서에 기재된 방법에 이용될 수 있다. 그러나, 사용된 탈세포화 기법으로 인해 이식편 조직 해부의 해부학적 구조가 전반적으로 파괴되지 않거나 또는 이의 구조적 성분의 생체 역학적 특성을 실질적으로 변경시키지 않아야 한다. 또한, 탈세포화 조직 매트릭스를 생성하는 조직의 처리는 수용체에 대해 동종이계성 또는 자가유래성 세포를 사용하여 매트릭스의 차후의 재개체군화 형성을 완화시키는 세포독성 환경을 초래하지 않아야 한다. 수용체에 대해 동종이계성인 세포 및 조직은 수용체와 동일한 종의 제공자로부터 유래하며, 이로부터 얻을 수 있는 것이다. 자가 유래성 세포 또는 조직은 수용체로부터 유래되거나 또는 이로부터 얻을 수 있는 것이다.

<34> 세포내 얼음 형성과 같은 물리적인 힘을 사용하여 이식편 조직을 탈세포화시킬 수 있다. 예를 들면, 무상해 심장 판막을 증기 상 냉동시키면(완만한 속도로 온도를 감소시킴) 액상 냉동(급속)에 비해 심장 판막 소편의 세포충실도를 감소시킬 수 있다. 그러나, 동결보존제의 부재하에서의 완만한 냉동법은 심장 판막 도관의 균열과 같은 조직 파괴를 초래할 수 있다. 콜로이드 형성 소재를 동결-해동 사이클 중에 첨가하여 조직내의 얼음 형성 패턴을 변경시킬 수 있다. 폴리비닐피롤리돈(10% w/v) 및 투석된 히드록시에틸 전분(10% w/v)을 표준 동결보존 용액(DMEM, 10% DMSO, 10% 태내 소 혈청)에 첨가하여 세포외 얼음 형성을 감소시키면서 세포내 얼음을 형성시킬 수 있다. 이는 콜라겐성 조직 매트릭스를 제공하면서 얼음으로부터의 손상을 방지할 수 있는 탈세포화를 측정할 수 있다. 또한, 이는 조직, 특히 심장 판막 도관을 동결보존제의 존재와 무관하게 급속하게 냉동시킬 경우 균열이 발생하는 것으로 알려져 있다.

<35> 또한, 생육가능한 생세포를 이식편 조직 또는 장기로부터 제거하기 위해 각종 화학 처리 또는 각종 효소를 사용할 수 있다. 예를 들면, 트립신과 같은 단백분해효소에 세포를 장시간 노출시키면, 세포 사멸을 초래한다. 그러나, 유형 I 콜라겐 분자의 적어도 일부분은 트립신을 비롯한 다양한 단백분해효소에 민감성을 지니므로 높은 기계적 응력을 갖는 부위에 이식시키고자 하는 콜라겐성 이식 조직에 대한 선택 접근 기회를 주지 않는다.

<36> 여러가지 각종 세정제, 예를 들면, 비이온성 세정제, Triton X-100 및 음이온성 세정제, 도데실 황산나트륨의 조합물은 세포막을 파괴하여 조직으로부터 세포 조직파편의 제거를 돕는다. 그러나, 생육가능한 세포에 의한 조직 매트릭스의 차후의 재개체군화 형성을 방해하지 않도록 조직 매트릭스중의 임의의 잔류 세정제를 제거하는 단계를 취하여야 한다.

<37> 이식 조직의 탈세포화 처리는 이식편 조직중의 생세포를 용해시키기에 효과적인 용액을 투여하여 실시되는 것이 바람직하다. 용액은 생세포 조직을 효과적으로 용해시키도록 제제화된 수성 저장성 또는 저 이온 강도 용액인 것이 바람직하다. 이와 같은 저장성 수용액은 탈이온수 또는 수성 저장 완충액일 수 있다. 상기 수성 저장성 완충액은 세포 용해의 결과로서 방출될 수 있는 소정의 단백분해효소, 예를 들면 콜라게나제의 활성에 대한 차선의 조건을 제공하는 첨가제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 금속 이온 킬레이트화제, 예를 들면, 1,10-페난트롤린 및 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)과 같은 첨가제는 다수

의 단백분해 효소에 불리한 환경을 제공한다. 콜라게나제와 같은 단백분해효소에 대한 차선의 조건을 제공하는 것은 용해 단계중의 분해로부터 조직 매트릭스 분해 방지를 도울 수 있다. 특히, 단백분해효소에 대한 차선의 조건은 저장성 용해 용액을 제제화시켜 용액중에 사용될 수 있는 칼슘 및 아연 이온을 감소시키거나 또는 그 양을 제한할 수 있다. 많은 단백분해효소는 칼슘 및 아연 이온의 존재하에 활성을 지녀서 칼슘 및 아연을 포함하지 않는 환경에서는 이의 활성이 크게 감소된다.

<38> 저장성 분해 용액은 생세포를 최적으로 용해하나, 하층에 있는 조직 매트릭스를 해로운 단백질 분해로부터 보호하도록, pH, 칼슘 및 아연 이온의 이용 가능성 감소, 금속 이온 킬레이트화제의 존재 및 콜라게나제, 예컨대 β 1-항콜라게나제에 대해 특이성을 갖는 단백분해 억제제의 사용과 같은 조건을 선택하여 저장성 용해 용액을 제조한다. 저장성 용해 용액의 예로는 칼슘 및 아연 이온을 포함하지 않으며 EDTA와 같은 금속 이온 킬레이트화제를 포함하는 pH 5.5~8, 바람직하게는 pH 7~8의 완충 수용액을 들 수 있다. 또한, 저장성 분해 용액을 사용하여 조직 매트릭스를 처리하는 동안 온도 및 시간 변수를 조절하는 것은 단백분해효소의 활성을 제한하는데 사용될 수 있다.

<39> 또한, 조직 매트릭스의 탈세포화 처리가 새로운 면역 부위의 생성을 제한하는 것이 바람직하다. 콜라겐이 통상 실질적으로 비면역원성인 반면, 콜라겐의 부분 효소 분해는 면역원성을 강화시킬 수 있다. 따라서, 본 방법의 바람직한 단계는 하층에 있는 콜라겐 매트릭스를 분해시키지 않으면서 세포 대사, 단백질 생성 및 세포분열을 억제하기에 효과적인 효소, 예컨대 뉴클레아제에 의해 조직을 처리하는 것을 포함한다. 생세포 DNA 및 RNA 의 소화에 사용될 수 있는 뉴클레아제의 예로는 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제등이 있다. 본 방법의 단계에서 사용하기에 적절한 매우 다양한 것들이 시판되고 있다. 예를 들면, 세포 활성을 효과적으로 억제시키는 엑소뉴클레아제의 예로는 DNAase I(미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미칼 컴패니) 및 RNAase A(미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미칼 컴패니) 등이 있으며, 세포 활성을 효과적으로 억제시키는 엔도뉴클레아제의 예로는 EcoR I(미국 미주리 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미칼 컴패니) 및 Hind III(미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미칼 컴패니) 등이 있다.

<40> 소정의 뉴클레아제는 뉴클레아제의 활성에 최적인 이온, 예컨대 마그네슘 및 칼슘 염을 포함하는 이온과 같은 것을 포함하는 생리적 완충액에 가하는 것이 바람직하다. 또한, 완충액의 이온 농도, 처리 온도 및 처리 시간은 소정의 효과적인 뉴클레아제 활성을 얻도록 선택되는 것이 바람직하다. 완충액은 세포 내부에 뉴클레아제의 접근을 촉진시키는 저장성인 것이 바람직하다. 비-사람 심장 판막 조직, 특히 돼지 또는 소의 판막의 내인성 내피 세포 처리의 경우, 조직을 뉴클레아제 DNAase I 및 RNAase A로 구성된 생리적 완충액으로 처리하는 것이 바람직하다. 뉴클레아제 분해 용액은 바람직하게는 약 0.1 ㎍/㎖~50 ㎍/㎖, 더욱 바람직하게는 10 ㎍/㎖의 뉴클레아제 DNAase I 및 0.1 ㎍/㎖~10 ㎍/㎖, 더욱 바람직하게는 1.0 ㎍/㎖의 RNAase A를 함유한다. 이러한 조직은 약 20℃~38℃, 바람직하게는 약 37℃의 온도에서, 약 30 분~6 시간 동안 상기의 것들을 가하여 조직을 탈세포화시키는 한편, 동시에 콜라겐 분해의 결과로서의 새로운 면역 부위의 생성을 제한한다.

<41> 기타 효소에 의한 소화도 본 명세서에서 이용하기에 적절하며, 예를 들면 이식 조직중의 생세포의 작용을 방해할 수 있는 효소를 사용할 수 있다. 예를 들면, 완충 용액내의 포스포리파제, 특히 포스포리파제 A 또는 C 를 사용하여 내인성 세포의 세포막을 분해시켜 세포작용을 억제시킬 수 있다. 사용된 효소는 조직 매트릭스 단백질에 유해한 효과를 끼치지 않는 것이 바람직하다. 사용하기에 적절한 효소는 세포 보전 저해 측면에서 선택될 수 있으며, 또한 세포 단백질 생산성을 방해할 수 있는 효소를 포함할 수 있다. 부형제의 pH 뿐 아니라, 부형제의 조성은 사용하기 위해 선택된 효소의 pH 활성 프로파일에 대해 조절된다. 더욱이, 조직에 효소를 가하는 동안의 온도를 조절하여 효소 활성을 최적화시켜야 한다.

<42> 선택된 탈세포화 처리에 이어서, 생성된 이식 조직 매트릭스를 세정하여 세포 단백질, 세포 지질 및 세포 핵산 뿐 아니라, 세포외 가용성 단백질, 지질 및 프로테오글리칸과 같은 세포외 조직파편을 포함할 수 있는 세포 조직파편을 제거한다. 상기 세포 및 세포외 조직 파편의 제거에 의해 이식시에 이식편 조직 매트릭스 수용체로부터의 해로운 면역 반응을 일으킬 가능성을 감소시킨다. 예를 들면, Hanks 평형 염 용액(HBSS)과 같은 평형 염 용액중에서 조직을 인큐베이트시킬 수 있다. 평형 염 용액 세정물의 조성 및 이를 이식편 조직 매트릭스에 적용한 조건은 탈세포화 처리중에 사용된 뉴클레아제 또는 기타 효소의 활성을 감소시키거나 또는 제거할 수 있도록 선택할 수 있다. 이와 같은 평형 염 세정액은 마그네슘 또는 칼슘 염을 포함하지 않는 것이 바람직하며, 세정 방법은 약 2℃~42℃, 가장 바람직하게는 4℃의 온도에서 인큐베이트하는 것을 포함할 수 있다. 이식편 조직 매트릭스를 10~12 일 동안 평형 염 세정액중에서 매 2일 또는 3일째에 세정액을 변화시키면서 인큐베이트시킬 수 있다. 임의로 항세균제, 항진균제 또는 살균제 또는 이의 조합물을 평형염 세정액중에 포함시켜 환경 병원체에 의해 오염으로부터 이식편 조직 매트릭스를 보호할 수 있다.

<43> 본 발명의 방법에 의한 이식을 위해 제조된 조직이 피부일 경우, 그 후의 시험관내 세포 재개체군화 형성 단계없이 탈세포화된 조직 매트릭스를 사용할 수 있다. 탈세포화되고 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스는 수용체에게 이식하기에 적절하다. 피부 조직 매트릭스의 면역원성 저하는 수용체의 면역계에 의한 이식 피부의 내성을 증가시키게 된다. 이후, 이식편 수용체 자신의 세포에 의해 이식편을 생체내 재개체군화시킬 수 있다. 피부 이식편으로서 사용하기 전에, 피부 매트릭스를 처리하여 수용체 자신의 피부 세포의 내방성장 및 부착을 강화시킬 수 있다. 예를 들면, 매트릭스를 부착 인자 또는 성장 인자, 예컨대 각질세포 성장 인자 또는 둘다로 처리하여 각질세포의 주입을 향상시킬 수 있다.

<44> 상기와 같은 방법으로 제조된 조직 매트릭스는 그 자체의 생세포를 함유하지 않으며, 따라서 세포 및 세포외 항원 성분은 조직 매트릭스에서 세척 제거된다. 조직 매트릭스를 콜라겐 매트릭스내의 새로운 면역 부위의 생성을 억제하는 방법으로 처리하는 것이 바람직하다. 그러나, 이러한 조직 매트릭스는 매트릭스의 추가의 처리를 위한 구성을 제공하는데 필수적인 기본 생체역학적 강도를 보유한다.

<45> 본 발명에 의해 처리된 조직 매트릭스는 차후의 사용을 위해 동결보존 처리될 수 있다. 탈세포화 이식편 조직의 동결보존 처리는 해동시에 본 발명의 단계에 의한 부가의 처리 또는 이식편 조직 생성물을 제공하도록 추가로 처리하기 위한 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스를 공급한다. 예를 들면, 재개체군화 형성 중에 사용되는 특정 세포가 동정될 때까지 조직 매트릭스는 목록으로 작성될 수 있다. 수용

체로부터 유도된 세포 또는, 특정 수용체와의 이의 면역학적 적합성을 기준으로 하여 사용하기 위해 선택된 다른 세포를 사용하여 조직 매트릭스를 재개체군화시키는 경우 특별한 용도로 지닐 수 있다.

<46> 또한, 이식 생조직을 본 발명의 임의의 방법을 실시하기 전에 동결보존시킬 수 있다. 탈세포화되지 않은 조직은 콜라겐성 조직 매트릭스와 결합된 생세포를 보유할 수 있다. 해동시 이러한 조직을 추가로 처리할 수 있다. 또한, 무상해 이식 조직의 동결보존 처리로 동결보존 처리에 의해 야기된 세포 사멸의 결과로서 조직의 탈개체화 처리를 도울 수 있다는 점이 유익하다.

<47> 조직의 동결 보존 처리 기술은 당분야에 공지되어 있다. 참고 문헌[브록뱅크, 케이.지.엠. Basic, Principles of Viable Tissue Preservation, Transplantation Techniques and Use of Cryopreserved Allograft Cardiac Valves and Vascular Tissue. 디.알. 클락(편저), 애덤즈 퍼블리쉥 그룹, 리미티드, 보스톤, 9-23 페이지]에는 조직 및 장기의 동결 보존 처리에 대해 기술하고 있으며, 본 명세서에 참고로 인용한다.

<48> 동결 보존 여부와는 상관없이, 조직 매트릭스를 후처리하여 동종이계성 또는 자가유래 세포의 부착 및 내방 이동을 강화시키도록 시험관내에서 처리할 수 있으며, 이는 이식 조직을 재개체군화 형성시키는데 사용할 수 있다.

<49> 세포 부착

<50> 특정 이론에 국한시키려는 의도는 아니지만, 세포를 조직에 부착시키는 몇가지 인자가 존재하는 것으로 알려졌다. 예를 들면, 조직 표면에 섬유아세포를 부착시키는 것은 세포 막 및 세포외 매트릭스 성분, 예를 들면 원섬유 및 시이트 형성 콜라겐, 프로테오글리칸 및 당단백질과 같은 생조직 사이의 상호작용을 포함한다. 혈청을 사용하지 않고 인큐베이트시킨 시험관내 피부 섬유아세포는 유형 I 및 유형 IV 콜라겐을 빠르고 균일하게 부착시킨다. 부착 정도는 배지에 혈청(사람 또는 태내 소, 1%의 혈청으로 최대 결합을 얻음) 첨가에 의해, 이어서 정제 피브로넥틴에 의해 증대시킨다. 두가지 피브로넥틴의 2개의 동종 세브유니트 각각은 2 가지 세포 인지 영역을 지니며, 이중 가장 중요한 부위는 Arg-Gly-Asp (RGD) 서열을 갖는다. 글리코스아미노글리칸을 결합시키는 제2부위는 상승적으로 작용하며, RGD 서열에 의해 중개된 피브로넥틴-세포 상호작용을 안정화시키는 것으로 나타났다. 콘드로이틴 황산염과 함께 헤파린 황산염은 세포 표면상에서 동정된 2 개의 글리코스아미노 글리칸이다. 헤파린 황산염은 내재성이거나 또는 막 스패닝이 될 수 있는 코어 단백질(신데칸 또는 하이알루로넥틴)에 결합된다. 세포외 매트릭스 당단백질에 대한 세포 결합 부위는 인테그린으로 불리우며, 이는 부착 인자에 세포를 강력하게 결합시키는 것을 중개한다. 각각의 부착 인자는 특수화된 인테그린을 갖는 것으로 알려져 있으나, 단일 인테그린은 몇몇의 세포외 매트릭스 인자에 결합될 수 있다. 섬유 아세포가 무상해 피브로넥틴(세포 및 헤파린 결합 도메인)에 결합되었을 경우, 이는 병소 부착으로 수반된 수축된 형태를 나타낸다. 헤파린 결합 도메인이 없는 경우, 섬유아세포는 퍼질수는 있지만, 병소 부착을 전개하지는 못한다.

<51> 그래서, 인자의 조합은 세포가 조직 표면에 결합될 수 있는 속도를 결정할 수 있다. 대부분이 섬유아세포 생성물이 되지만, 피브로넥틴과 같은 몇몇이 혈청 보충물로부터 얻을 수 있다. 인자를 세포에 의해 발현시키고 분비하는 속도는 세포의 표면 부착에 영향을 끼치며, 섬유아세포 성장 인자 및 형질전환 성장 인자-β 와 같은 시토킨은 섬유아세포 콜라겐 및 피브로넥틴 생성에서의 양성 조절물이다.

<52> 세포를 조직 매트릭스에 효과적으로 부착시키는 것은 세포막과 대응하는 이식편 조직과 관련이 있는 세포외 성분과의 상호작용에 의해 촉진되는 것으로 생각된다. 따라서, 소정의 세포 유형 및 사용하기 위해 선택된 조직 유형에 대해서는 탈세포화 조직 매트릭스에 세포 부착을 촉진시키에 유효한 세포외 조직 성분, 특히 세포외 단백질, 예컨대 탈세포화시킨 조직 매트릭스에 세포를 부착시키는데 효과적인 당단백질 및/또는 프로테오글리칸 또는 글리코스아미노글리칸을 사용한 처리가 있다. 따라서, 세포를 사용하여 조직 매트릭스를 재개체군화 형성시키는 바람직한 기술은 우선 탈세포화 매트릭스에 재개체군화 형성 세포를 부착시키는 것을 촉진시키기에 효과적인 세포 부착 인자로 상기 탈세포화 조직 매트릭스를 처리하여 실시된다.

<53> 예를 들면, 세포외 매트릭스 단백질, 예컨대, 피브로넥틴 및 글리코스아미노 글리칸을 포함하는 영양 용액 중에서 재개체군화 형성시키고자 하는 이식편 조직 매트릭스의 표면으로의 피브로넥틴 결합에 효과적인 기간동안 상기 탈세포화 조직 매트릭스를 인큐베이트시킬 수 있다. 피브로넥틴/글리코스아미노글리칸과 함께 사용하기 위한 바람직한 완충액의 예로는 인산나트륨/글리세린/소 혈청 알부민(태내 소의 혈청, 바이오-휘태커) 및 둘베코의 변법에 의한 이글즈(Eagle's) 배지(DMEM)(Gibco)가 있다. 이러한 완충액은 약 7.0~7.6의 생리적 허용 pH를 제공하는데 사용된다. 세포외 매트릭스 단백질의 존재에 의해 매트릭스를 재개체군화 형성시키기 위해 선택된 세포가 부착되는 조직 매트릭스상에 표면이 형성된다. 세포외 매트릭스 단백질의 자극할 경우, 이식 조직내의 세포 재개체군화 형성을 촉진시킨다.

<54> 본 발명에 사용하기에 바람직한 세포외 매트릭스 단백질은 무상해 분자 형태의 피브로넥틴(사람 혈장 피브로넥틴, 업스테이트 바이오테크놀로지, 인코오포레이티드)이다. 헤테로작용성 당단백질은 세포외 매트릭스 단백질, 프로테오글리칸 및 특정 세포 유형에 대해 친화성을 갖는다. 또한, 피브로넥틴 처리 용액은 글리코스 아미노글리칸 헤파린, 헤파린 황산염, 콘드로이틴, 콘드로이틴 황산염, 더마틴 또는 더마틴 황산염 중의 하나일 수 있는 프로테오글리칸을 포함하는 것이 바람직하다. 글리코스아미노글리칸은 콜라겐과 관련이 있는 조직 매트릭스 및 피브로넥틴 사이의 결합을 촉진시키고 안정화시키는 것으로 알려졌다. 매트릭스는 화학적으로 가교되지 않기 때문에 피브로넥틴과의 상호작용시킬 수 있는 것이 이롭다.

<55> 피브로넥틴 공급원은 바이러스에 의한 오염을 제한하도록 처리된 사람의 혈액이다. 바람직한 글리코스아미노글리칸은 헤파린이다. 조직 매트릭스를 처리하는 부착 인자로서 사용된 당단백질의 농도는 약 1~약 100 ㎍/㎖이며, 피브로넥틴의 농도는 10㎍/㎖인 것이 바람직하다. 피브로넥틴 : 헤파린의 바람직한 중량비는 피브로넥틴 약 10 부 : 글리코스아미노글리칸, 예컨대 헤파린 약 1 부이다. 이는 돼지 심장 판막 소편의 재개체군화 형성에는 최적이지만, 사용된 조직에 따라서 약 0.1:1~약 10:0.1이 될 수 있다.

<56> 용액이 이식편 조직 매트릭스가 인큐베이트될 영양 배지에 후에 첨가되는 성장 인자와 적합성을

갖도록 부착 인자를 포함하는 영양 용액의 성분을 선택하는 것이 바람직하다. 성장 인자를 사용하여 조직 매트릭스의 세포 증식 및 재개체군화 형성을 촉진시킨다.

<57> 세포 재개체군화 형성

<58> 본 발명의 중요한 양태는 탈세포화 이식편 조직 매트릭스를 시험관내에서 세포를 사용하여 재개체군화 형성시킬 수 있다는 것이다. 탈세포화 매트릭스를 재개체군화 형성시키는데 사용되는 세포는 의도하는 이식편 수용체와 동일한 종으로부터 배양된 동종이계성 세포이거나 또는 이식편 수용체로부터 배양된 자가유래성 세포로 할 수 있다. 어떤 경우에도 이종이식조직이나 키메라 이식조직으로 알려진 재개체군화 형성된 조직 매트릭스중의 자가유래 또는 동종이계 세포는 미처리 이종발생성 이식편 조직보다 해로운 면역 반응을 적게 유발시킨다.

<59> 또한, 탈세포화 매트릭스를 재개체군화 형성시키는데 사용된 세포로는 특이성 단백질 생성을 증진시키도록 유전자 조작시킨 세포인 것으로 생각된다. 다수의 재조합 DNA 기술이 세포 대사의 변화, 증진, 개질에 관련되어 있다는 것은 당해 기술분야에 공지되어 있다.

<60> 재개체군화 형성 과정은 세포 증식 및 이에 따른 조직 매트릭스의 재개체군화 형성을 촉진시키는 활성을 나타내는 세포 및 성장 인자를 함유하는 영양 배지내에서 세포 부착 인자로 처리한 조직 매트릭스를 인큐베이트함으로써 수행할 수 있다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 세포 유형은 섬유아세포이다.

<61> 각종 물질을 사용하여 세포 화학주성을 증진시키고, 용액중의 물질의 농도 구배에 따른 방향성 이동 속도를 증가시킬 수 있다. 섬유아세포와 관련해서는, 섬유아세포 성장 인자, 혈소판-유래의 성장 인자, 형질전환 성장 인자-β 및 기질-부착 분자, 원섬유성 콜라겐, 콜라겐 단편 및 피브로넥틴이 섬유아세포에 대한 화학 주성물질이다. 세포 부착과는 달리, 섬유아세포 이동에는 신규 단백질 합성을 요하며; 정상적인 섬유아세포에서의 단백질 합성은 피브로넥틴으로의 세포 부착에 의해 자극되고, 이에 의해 재개체군화 형성중 세포 부착과 세포 이동 과정은 상호관련이 있는 것으로 보인다.

<62> 또한, 세포 이동에는 또한 조직 매트릭스 재개체군화 내부 간극성 공간 뿐아니라 조직 이식편 매트릭스의 표면을 통해 세포를 이동시킨다.

<63> 특정 이식편 조직 매트릭스를 완전히 재개체군화 형성시키는데 필요한 세포의 수는 사용된 조직의 용적과 제공된 세포의 유형에 따라 좌우된다. 그러나, 1 ㎖당 20,000～125,000 개의 섬유아세포 농도가 심장 판막 소편과 대동맥 도관 조직을 적절한 적용범위를 제공할 수 있다.

<64> 세포 증식

<65> 조직 매트릭스의 세포 재개체군화 형성 단계는 매트릭스를 재개체군화 형성하는데 사용된 배양 세포의 증식을 촉진시키는데 효과적인 성장 인자의 존재하에서 수행하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 섬유아세포 사용시, 본 발명에 사용되는 성장 인자로는 섬유아세포 성장 인자(FGF), 가장 바람직하게는 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)(사람 재조합 bFGF, 업스테이트 바이오테크놀로지,인코오포레이티드)가 가능하다.

<66> 섬유아세포 성장 인자(헤파린-결합)는 간염 세포에 작용하는 유사분열물질의 일종이다. FGF는 상태조절된 배지중에서는 존재하지 않는 것이 검출되지 않았으나, 그 대신에 FGF는 헤파린 황산염과 관련하여 세포외 매트릭스중에서 발견되며, 이식편 조직 매트릭스에 미리 결합된 피브로넥틴-헤파린 층내에서 편재한다. 글리코스 아미노글리칸은 FGF 활성을 안정화시키는 것으로, 오토크린(autocrine)/파라크린(Paracrine) 성장을 자극하는 경우에 세포 표면 수용체와 결합시키는데 FGF가 요구된다.

<67> 매트릭스와 세포는 정상적인 판막 기능에 필요하도록 재개체군화 형성 단계 중에 지속적으로 bFGF에 노출시켜 세포 복제 및 콜라겐 단백질 합성의 발현을 자극시키는 것이 바람직하다. 성장 인자를 사용한 매트릭스의 배양 기간은 10 일～21일의 범위이다. 조직 매트릭스를 처리하는데 사용된 성장 인자의 농도는 100 ng/㎖～10 ㎍/㎖의 범위가 되며, bFGF와 관련한 성장 인자의 농도는 2.5 ㎍/㎖가 바람직하다.

<68> 섬유아세포를 이식편-재개체군화 형성 세포로 사용할때, 배양 배지로는 혈청이 5-15% 첨가된 둘베코 변법에 의한 이글즈 배지(Gibco)가 있다. 자가유래성의 수용체 혈청이 바람직하지만, 동종이식편 심장 판막 이식 경험에 의하면, 성장 배지 중에 소의 혈청을 사용하여도 이식편 수용체에게 해로운 면역 결과가 나타나지 않을 수도 있다는 것을 시사한다. 재개체군화 형성 세포에 의해 상태조절된 배지와 혈청을 사용하여 세포를 지속적으로 자극시키면, 조직 매트릭스에 의해 더욱 급속한 세포 재개체군화 형성을 유발시킬 수도 있다. 매트릭스, 세포 및 성장 인자를 37℃의 습윤 대기중에서 인큐베이트할 수 있으며, 배양 기간 중에는 95% 공기 및 5% CO_2 혼합물을 사용한다.

<69> 신선한 조직과 유사한 간극 조직구조를 갖는 재개체군화 형성된 이식편을 생성하기에 충분한 시간동안 이식편 조직 매트릭스를 배양한다. 세포 재개체군화 형성 과정 종료시, 조직은 새로운 조직과 유사한 대사 변수를 나타내는 것이 또한 바람직하다.

<70> 세포 생존도

<71> 본 발명의 중요한 양태는 이식편 수용체에게 면역적으로 허용되거나 또는 실질적으로 비-면역원성이라는 점외에, 재개체군화 형성된 이식편 조직이 이식 전에 기능하고 있으며 생육가능하다라는 점이다. 세포 활성을 측정하기 위해 각종 분석이 존재하며, 이들 분석법을 본 방법의 이식편 조직에 적용시키는 경우, 이식편 조직을 재개체군화 형성시키는 세포의 생존도를 모니터하고 정량화하는 방법을 제공한다.

<72> 이식편 조직의 의도하는 기능과 관련있는 세포 활성을 측정하는 분석법을 선택하는 것이 바람직하다. 일례로, 콜라겐 생성이 심장 판막의 기능을 유지하는 데 있어서 중요하다. 심장 판막 소편에서는, 생성된 모든 단백질의 5～15%가 콜라겐이다. 이중 75% 이상이 유형 I 콜라겐이다. 따라서, 재개체군화 형성된 심장 판막을 분석하는데 있어서는, 세포 생존도의 정확한 측정치로서 재개체군화 형성 세포에 의해

생성된 모든 콜라겐을 분석하는 것이 바람직하다. 콜라겐 생성을 측정함으로써 세포 활성을 측정하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 세포 콜라겐 생성에 대한 분석에 관해 기술되어 있는 참고문헌의 일례로 문헌 [버클리, 에이. 외 다수, 1980 Collagen Metabolism., Methods of Enzymology, 163:674-69, 및 하야시, 티. 및 나가이, 와이. 1979, Separation of the a Chains of Type I and III Collagens by SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis, Journal of Biochemistry, 86:453-459]을 들 수 있으며, 이들 문헌은 본원 명세서에 참고로 인용된 것이다.

<73> 세포 생존도를 측정할 수 있는 기타 분석법도 본 발명에 사용할 수 있다. [^{3}H]프롤린의 혼입에 의해 총 단백질 합성량을 측정하는 것도 상기한 분석법의 일종이다. 세포 생존도를 측정하는데 사용할 수 있는 또다른 분석법에는 글루코즈의 대사를 분석하는 방법과 미토콘드리아의 활성에 관한 각종 분석법이 포함된다.

<74> 생육 가능 세포를 표시하는 세포 기능을 정량적으로 측정하는 분석법을 사용하여도 무방하다.

<75> 기능 분화

<76> 섬유아세포는 대부분의 결합 조직 성분을 생성하는 역할을 한다. 이들은 상이한 각종 콜라겐 유형을 합성하며, 표현형은 특정의 조직 환경에 맞게 나타난다; 즉, 배양 섬유아세포는 그 기원 부위에 따른 콜라겐 유형을 합성한다. 섬유아세포는 또한 각종 글리코사미노글리칸과 피브로넥틴 및 성장 인자를 생성한다. 피부 섬유아세포는 이식편 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하고 본원 명세서에 기술된 하이브리드 이식편을 형성하는 적절한 세포로 만드는 심장 판막 소편의 매트릭스중에 존재하는 비율로 유형 I, III 및 V 콜라겐을 합성하는 피부 섬유아세포의 능력을 가지고 있다.

<77> 특정 이식편을 재개체군화 형성시키는데 사용되는 세포는 광범위한 범주내에서 변화될 수 있으며, 이식편의 기능, 교체 또는 증대시키고자 하는 조직의 성질, 수용체의 알레르기 민감도 그리고 다른 요인들에 의해 다른 환경에서는 다른 유형의 세포가 사용될 수 있다.

<78> 본 발명의 바람직한 구체예에서는 본원 명세서에 기술된 방법에 자가유래성 세포를 사용한다. 이식 수술전에 수용체로부터 조직 샘플을 채취한다. 이 조직을 후술되는 방법에 따라 처리하여 섬유아세포나 다른 세포들을 생성하고, 이후 본 방법에 따라 이를 사용하여 동종이계성 또는 이종발생성 조직 매트릭스를 재개체군화 형성시킨다. 수용체로부터 채취한 절제 조직으로부터 유래된 세포로, 미리 준비한 탈세포화하여 처리한 이식 조직 매트릭스를 재개체군화 형성함으로써, 유해한 면역계 반응과 이에 따른 이식편 거부반응 같은 것들을 최소화하거나 피할 수 있다.

<79> 세포 공급원은 이식하고자 하는 조직과 부합되도록 선택할 수 있다. 일례로, 혈관을 이식하고자 하는 경우에는, 수용체의 건강한 혈관으로부터 세포를 채취하여 이를 이식편 재개체군화 형성용 세포의 공급원으로서 사용할 수 있다. 이러한 방식으로, 건강한 이식편을 수용체의 질환 조직에 아주 근접하게 부합되도록 할 수 있다.

<80> 본 발명의 이러한 양태는 이식 가능한 혈관에 대해 이식편 수용체가 고 알레르기성이거나 조직이고 면역원성일 경우에 특히 유용하다.

<81> 또는, 이식편에 영향을 미치는 허용가능하지 않은 면역 반응을 야기시키지 않을 것으로 보이는 동종이계성 세포주를 사용하여 조직 매트릭스를 재개체군화 형성시킬 수도 있다. 미약하거나 허용가능한 정도의 알레르기 반응을 나타내는 세포를 사용하여 조직 매트릭스를 재개체군화 형성시킴으로써 실질적으로 비-면역원적 이식편을 제공하는 것도 가능하다. 이들 세포는 본래 면역원성이 미약한 것이거나 또는 재조합 세포 기술에 의해 미약한 면역원성을 가지도록 디자인된 것일 수 있다.

<82> 섬유아세포 분리 방법

<83> 섬유아세포 링크, 예를 들면 피부(엉덩이, 허벅지 또는 등) 또는 심장 판막 소편을 제공하기 위해 사용되는 조직은 멸균 회수하여 완충 영양 배지중에서 처리 장치에 공급한다. 멸균 절제 기술을 이용하여 조직을 1 ㎣ 조각으로 절단한다. 이어서, 10 조각으로된 그룹을, 조직을 습윤시키되 조각이 부유되지 않도록 충분량의 배양 배지(DMEM + 10% 태내 소 혈청)가 포함된 35 ㎜ 조직 배양 접시에 넣는다. 5% CO_2를 함유하는 대기중의 습윤 배양 인큐베이터 중에서 37℃하에 1주간 인큐베이트한다. 1주 인큐베이트후, 각 조직 조각이 과도성장한 밀집 섬유아세포에 의해 포위된다. 상피 세포는 존재할 수도 있지만 후속되는 세포 배양 중에 소실된다. 세포를 칼슘 및 마그네슘을 함유하지 않은 멸균 완충 염 용액으로 행군후, 표준 트립신 분해에 의해 섬유아세포를 분리해내어 신선한 배양 배지를 포함하는 대형 세포 배양 용기에 넣는다. 세포 배양물도 이러한 방식으로 확장할 수 있다. 플라스크의 내용물을 나누어 세개의 대형 용기에 넣고, 이 과정을 1주 약 1회 반복할 수 있다. 이들 플라스크에서 회수된 세포를 재개체군화 형성 세포의 공급원으로서 사용한다. 이러한 방식으로 얻을 수 있는 세포는 대부분의 세포주가 표현적으로 변화되었고, 성장 조절제(예, bFGF)에 대한 정상적인 방법으로 더이상 반응하지 않기 때문에, 시판 세포주로 하여도 바람직하다. 대부분의 시판 세포주는 본래의 양과 비율의 중요 단백질 생성물(예, 콜라겐)을 생산하지 않는다.

<84> 본 발명의 바람직한 구체예는 천연 세포와 가용성 단백질을 제거하기 위해 처리한 이종이식편을 포함하는데, 이종이식편을 재개체군화 형성시키는데 사용된 세포에 대해 무-독성이 되도록 하고, 이어서 최종 이종이식편 조직 매트릭스가 생체역학적으로 건강하고 무상해가 되도록 조건을 선택한다. 이후, 탈개체화 처리된 이종이식편 조직 매트릭스를 세포외 매트릭스 당단백질 인자와 글리코스아미노글리칸으로 처리한다. 그 후, 이종이식편을 성장 인자와 글리코스아미노글리칸으로 처리한 후, 이식편에 부착되는 외인성 세포와 함께 인큐베이트한다. 이들 외인성 세포는 이식편내로 이동하고, 이식편내에서 증식시키며, 필수 단백질과 이식편의 기능에 중요한 기타 인자를 발현시킨다. 재개체군화 형성된 이종이식편은 재개체군화 형성 세포에 의해 생물학적 작용성을 지니며, 미처리 이종이식편이나 화학적으로-고정된 이종이식편에 비해 감소된 또는 면역원성 감소 또는 최소의 면역원성을 나타낸다. 항원성 감소가 조직의 최초 탈개체화 처리중에 이종항원이나 동종항원 제실질적으로 결과이며, 그리고 수용체에 의해 이물질로 인식되지 않은 재개체군화 형성 세포의 존재에 의해 나타난다. 이들 키메라 이식편은 조직 채취중 또는 조직의 탈

세포화중에 세포 사멸의 결과이며, 형성되는 세포 조직파편을 세척 방식에 의해 제거하였기 때문에, 석회화 경향이 감소되는 것으로 나타난다. 이들 키메라 이식편은 전술한 절차의 결과로서 라이닝층의 세포를 보유하고 있기 때문에, 혈전 및 미소색전의 형성 경향도, 기계적 구조물, 정제된 생체 분자로부터 만들어진 구조물 및 화학적으로 고정된 생체인공 삽입물 조직과 비교하여 감소된다.

실시예

<85> 실시예 1

<86> 저장성 용해/뉴클레아제 소화 절차에 따른 돼지 대동맥 판막 소편, 대동맥 도관 및 관련 심근층의 탈개체화 처리

<87> 조직 구조에 영향을 미치는 비제어된 세포 분해의 작용을 제한하기 위해 도살 2시간 이내의 돼지 심장을 채취하고, DMEM 멸균 용액 중에서 4℃에서 처리 3장치로 보냈다. 멸균 조건하에서 대동맥 심장 판막을 절제하고, 5% CO_2 대기하에 영양 배지중에서 37℃에서 16 시간 동안 항생물질 혼합물 중에 인큐베이트하며, 10% DMSO와 10% 태내 소 혈청을 함유하는 DMEM중에서 동결 보존(냉각 속도 = -1℃/분)하였다. -179℃에서 보존한 후, 37℃에서 판막을 급속 해동하였다. 판막으로부터 소편, 대동맥 도관 및 심근층을 절단해내고, 세분한 유형의 조직을 후에 조직 분석용으로 10% 포르말린 완충액중에 직접 넣거나 또는 탈개체화 형성을 위해 처리하였다. 락테이트 링거-5% 덱스트로즈 용액중에서 각기 실온에서 15분 동안 3회 세척한 후, 조직을 실온에서 2시간 동안 18 MQ 수중에서 인큐베이트한후, 3 mM 마그네슘과 1 mM 칼슘 염을 함유하는 10 mM Tris-Cl(pH 7.6)중에 용해된 10 ㎍/㎖ DNAase I 및 1 ㎍/㎖ RNAase A중에서 37℃에서 120분 동안 분해하였다.

<88> 용해 처리후, 조직을 DMEM-5% FBS중에서 8 시간 동안 인큐베이트하였다. 이때, 처리한 조직을 포르말린으로 고정시켰다. 모든 고정된 조직을 파라핀에 넣고, 절편으로 만들어 헤마토크실린과 에오신을 사용하여 세포를 육안으로 관찰할 수 있도록 염색시켰다. 도 1은 대표적인 현미경 사진으로서, 섬유성 및 심실 표면의 내피층 및, 전체 조직 두께를 통해 섬유아세포상를 갖는 신선한 대동맥 소편의 세포 충실도를 나타낸 것이다, 도 2a 및 도 2b는 본질적으로 무세포 외관과 함께 탈세포 후 각각 폐동맥 판막 도관 및 심근층의 현미경 사진을 나타낸 것이다.

<89> 실시예 2

<90> 소의 피부 섬유아세포에 의한 탈개체화 처리된 돼지의 대동맥 판막 소편의 재개체군화 형성

<91> 돼지의 대동맥 소편을 회수하고 실시예 1에 기술된 바와 같이 탈개체화 처리시켰다. 소편을 37℃에서 5 ㎖ NaH_2PO_4/글리세린/BSA 완충액중에서 인큐베이트하였다. 1 ㎍/㎖헤파린과 함께 16시간 동안 사람 혈장 피브로넥틴을 완충액에 첨가하여 10 ㎍/㎖의 농도로 하고, 이후 0.83 ㎍/㎖헤파린과 함께 6시간 동안 사람 재조합 bFGF를 첨가하여 농도를 2.5 ㎍/㎖로 하였다. 이를 인큐베이트한후, 표준 외식편 배양 기술에 의해 미리 분리한 소 피부 섬유아세포를 2 x 10^4 세포/㎖로 심장 판막 소편에 첨가하였다. 이 소편과 세포를 11 일 동안 인큐베이트하였다. 인큐베이트후, 조직 분석을 위해 판막 절편을 포르말린에 넣어두었다. 도 3a는 탈세포화 대동맥 소편의 대표적인 현미경사진이다. 도 3b는 피브로넥틴과 bFGF로 처리한 탈세포화 대동맥 소편의 대표적인 현미경사진으로, 외인성 섬유아세포를 사용한 재개체군화 형성을 나타낸 것이다.

<92> 실시예 3

<93> 신선한 조직 및 탈개체화 처리된 조직과 비교하여 재개체군화 형성된 조직내에서의 섬유아세포의 생화학적 활성

<94> 실시예 1에서와 같이 돼지의 대동맥 심장 판막 소편을 탈개체화 처리하고, 실시예 2에서의 기술에 따라 양의 피부 섬유아세포의 상이한 2가지 분리물로 재개체군화 형성시켰다. 재개체군화 형성후 10일째에, 소편을 새로운 용기로 옮기고, 젠타마이신을 함유하는 DMEM에 용해된 1.0 μCi/㎖ [^{3}H]프롤린 및 50 ㎍/㎖ 아스코르브산, 50 ㎍/㎖ β-아미노프로피오니트릴 중에서 48시간 동안 인큐베이트하였다. 합성된 전체 단백질을 10% 트리클로로아세트산으로 측정하고, 배지로부터 침전 방사능을 회수하며, 단백질분해를 방지하기 위해 조직 추출물을 N-에틸말레이미드중 10 mM, EDTA중 25 mM, 및 페닐메틸설포닐 플루오라이드 중 10 mM로 하여 단백질 분해를 방지하고, 비-특이성 단백분해효소 활성을 갖지 않는 클로스트리디알(clostridial) 콜라게나제로 소화시켜 침전된 단백질을 추가로 분석하여 콜라겐 함량을 결정하였다. 도 4에 제시된 바와 같이, 탈개체화 처리된 조직의 단백질 합성 활성은 전혀 없었다. 재개체군화 형성후, 유의의 단백질 합성을 [^{3}H]프롤린 혼입에 의해 검출하였다. 이는 신선한 돼지 조직에서 측정한 바와 동일한 속도로 합성하였다. 콜라겐은 총 단백질 합성의 3.6%를 차지하는 것으로 나타났으며, 이중 대부분은 배지중에 분비되었다. 이러한 결과는, 본 발명의 바람직한 구체예에서 기술된 탈개체화 처리 절차에 의해 처리된 돼지 소편이 일반적으로 단백질 합성 능력을 나타내지 않고, 특히 콜라겐 합성 능력을 전혀 나타내지 않음을 의미한다. 재개체군화 형성 절차의 성공적인 응용은 재개체군화 형성 절차중에 외인성 섬유아세포를 제공함으로써 단백질 합성의 세포 능력을 탈개체화 처리된 소편으로 부여하는 능력에 의해 나타난다.

<95> 실시예 4

<96> 토끼에게 주입한 탈개체화 처리된 돼지 소편 추출물에 대한 체액성 면역 반응 감소의 입증

<97> 실시예 1에 기술된 절차에 의해 세포와 가용성 단백질을 제거하였다. 동결 보존 처리된 생육 가능 소편과 비교하여 탈개체화 처리된 소편의 면역학적 결과를 조사하였다. 체액성 면역 반응 연구 결과를 도 5 에 제시하였다. 항체 포획 기술을 이용하여 체액성 면역 반응을 평가하였다. 이 경우, 미변형된 동결 보존 처리 소편의 0.1 M NaCl에 용해된 항원 추출물을 사용하여 변형된 세포 탈개체화 처리된 소편이나 대조용 소편의 NaCl 추출물로 면역시킨 토끼로부터의 혈청을 스크리닝하였다. 50% (v/v) 프로인트 완

전 보조제 중에 상기한 추출물을 유화시키고; 이 유탁액의 0.1 ㎖ 부분을 뉴질랜드산 수컷 흰 토끼 각각의 등의 10개 부위에 피내 투여하였다. 2 주후, 불완전 프로인트 보조제중에 유화시킨 동결 보존 또는 탈개체화 형성된 소편의 추가 추출물로 동물을 재시험하였다. 1.5 개월후, 동물로부터 채혈을 하였다. 면역혈청을 준비하고, 알칼리성 포스파타제와 포합된 염소 항-토끼 IgG 및 염소 항-토끼 IgM 항혈청을 사용하여 IgG 및 IgM 항체 모두에 대해 스크리닝하였다. 도 5에는 탈개체화 처리된 조직 수용체로부터 채취한 혈청이 동결 보존 처리된 소편 추출물로 면역시킨 토끼에서 관측된 IgG 반응의 ~50% 및 IgM 반응의 <5%를 나타냈다. 이러한 사실은 본 발명의 바람직한 구체예에 기술된 기법에 의해 탈개체화 처리된 조직에 대한 체액성 면역 반응이 약화되었음을 나타낸다.

<98> 실시예 5

<99> 토끼에게 이식한 탈개체화 처리된 돼지 소편에 대한 세포 면역 및 염증 반응 감소의 입증

<100> 실시예 1에 기술된 절차에 의해 세포와 가용성 단백질을 제거하였다. 탈개체화 처리된 (무세포성) 및 동결 보존 처리된 (세포성) 돼지의 대동맥 판막 소편의 분할된 조각을 뉴질랜드산 수컷 흰 토끼의 배측 척골아래에 형성된 낭내로 삽입하였다. 이 낭을 폐쇄시키고, 2 주후, 이식편과 주변 조직(피부~근육)을 외과적 수술에 의해 회수하여 파라핀 삽입된 부분을 헤마톡실린과 에오신으로 염색시킨후, 조직 병리학적 분석용 포르말린중에 고정시켰다. 도 6은 탈개체화 처리된 소편이 동결 보존 처리된 대조용과 비교하여 최소 세포 반응을 일으키는 것을 나타낸 것이다. 내피 세포층 뿐 아니라, 섬유아세포 모두를 포함하는 동결 보존 처리된 조직은 이식편 주변과 이식편 자체내에 있는 이종친화구 및 임파구와 혈장세포에 의해 유의한 면역 및 염증 세포 반응을 자극하였다. 탈개체화 처리된 조직 이식체에서, 염증 및 면역 세포는 그 수가 소수이며, 분포가 한정되어 있다.

<101> 실시예 6

<102> 사람 수용체내에서 돼지 조직의 과민성 거부 반응을 일으키는 항원 제거의 입증

<103> 실시예 1에 기술된 절차에 의해 돼지 대동맥 심장 판막 소편과 대동맥 도관으로부터의 세포와 가용성 단백질을 제거하였다. 이들 조직과 신선하고 동결 보존 처리된 돼지의 대동맥 심장 판막으로부터의 그 대응물을 분할한 조각을 냉동절단 봉입제내의 액체 질소중에서 신선-동결시키고, 이를 8-10 μm 단편으로 절단한 후, 전하-개질된 유리 슬라이드상에 올려놓았다. 4℃ 아세톤에서 고정시킨 후, 돼지 세포의 막상에서 발견된 특이성 갈락토즈-α1,3-갈락토즈 변형된 단백질과 결합하는 비오틴-포합된 반데이라에아 심플리시폴리아(Bandeiraea simplicifolia) 렉틴-I으로 조직을 프로빙하였다. 이들 변형된 단백질은 영장류(사람 포함)에서 돼지 조직의 과민성 거부 반응을 일으키는 예비형성된 천연 항돼지 항체의 결합 부위이다. 그 후, 절편을 비오틴-포합된 호오스래디쉬 퍼옥시다제-아비딘 혼합물, 과산화수소 및 3,3'-디아미노벤지딘과 반응시켜 렉틴을 결합시키는 단백질을 검출하였다. 돼지 항원의 존재는 발색에 의해 검출한다. 도 7a는, 절편의 현미경 분석 결과로부터 동결 보존 처리된 대동맥 소편내 세포 관련된 항원을 나타낸 것이다. 도 7b는 대동맥 소편의 탈세포화후 현저히 감소된 항원 결합을 나타낸 것이다. 이러한 연구는 본 발명의 바람직한 구체예에서 제시된 바와 같은 탈개체화 처리 절차가 사람 수용체에 의한 돼지 이식편의 거부 반응을 일으키는 것으로 생각되는 중요한 항원을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

<104> 실시예 7

<105> 탈개체화 처리된 돼지 대동맥 심장 판막 소편의 생체역학적 특성 - 응력-변형률 분석

<106> 신선한 상태로 채집된 돼지 대동맥 심장 판막을 항생물질 혼합물로 멸균시키고, 세포 생육성을 유지하는 조건하에서 동결 보존 처리하였다. 탈개체화 처리를 위해, 대동맥 판막을 37℃에서 급속 해동시킨후, 저 저장성 용액, 뉴클레아제 및 평형 염 용액으로 10 일간 처리하였다. 생체역학적 시험을 위해, 소편을 원주상 또는 방사상 스트립으로 절단하고, 교정 클램프 압력하에서 Instron 모델 1011 소재 시험기상에 설치하였다. 조직을 시험중에 37℃ 또는 4℃ 행크스 평형 염 용액중에 담가놓았다. 게이지 길이를 측정하고 20회 예비조건조절 주기(원주상 스트립의 경우 100 g 부하 및 방사상 스트립의 경우는 180 g 부하)를 거친 후, 각 시험체를 다음과 같이 시험하였다:

<107> 1) 단일 부하 대 신장율 시험 결과는 도 8에 제시된 바와 같다. 방사상 스트립이 모든 조건하에서 원주상 스트립보다 더욱 잘 늘어났다. 조직 계수는 어떠한 처리에도 영향받지 않았으며, 탈개체화 처리된 방사상 스트립이 신선한 조직보다 훨씬 더 잘 늘어났다(113±11.8 대 85.9±8.6 mm/mm).

<108> 2) 응력 완화 시험 결과는 도 9에 제시된 바와 같다. 원주상 및 방사상 스트립의 경우, 최초 응력의 대략 10%가 처음 10초간 소실되었다. 전반적으로, 응력의 손실율은 방사상 스트립에서 더욱 크게 나타났으며, 동결 보존 처리된 방사상 스트립에서 가장 빨랐다. 시험 종료시에, 37℃ 탈개체화 처리된 원주상 스트립에 남아 있는 응력은 신선한 조직에서보다 훨씬 더 컸으며; 방사상 스트립에서는 차이가 실질적으로 없었다.

<109> 3) 인장력 파괴 시험 결과는 도 10에 제시된 바와 같다. 각 조건에 대해, 방사상 스트립보다 원주상 스트립이 더 강하고, 빳빳하며, 단단하였다. 동결 보존 처리 및 탈개체화 처리는 원주상 방향으로 측정한 이들 변수에 영향을 주지 못했다. 둘중 한 온도에서 탈개체화 처리된 조직으로부터의 방사상 스트립 절편은 신선한 절편에 비해 더욱 큰 인성을 나타냈다.

산업상이용가능성

<110> 본원 명세서의 기술 내용은 주로 본 발명의 바람직한 구체예에 대해 기재하고 있다. 그러나, 다수 변형된 구체예도 본 발명의 범주내에 속하는 것으로 간주된다. 교시내용과 실시예에 따르면, 본 발명의 중요한 특징은 1) 사람내 이식가능한 이식편으로 잠재적으로 이용가능한 조직으로부터 이종발생성 세포와 세포막의 제거; 2)세포외 매트릭스 당 단백질, 글리코스아미노글리칸 및 성장 인자의 영향하에서 이식편 수용체로부터 얻을 수 있는 가능성이 있는 무세포 조직을 외인성 세포와 함께 재개체군화 형성 가능; 3) 안정한 이식편 소재로서 자체를 이용할 수 있도록 동결 보존 처리된 조직과 유사한 생체역학적

특성 유지; 및 4) 탈개체화 처리 과정의 결과로서, 수용체내 염증성 및 세포 및 체액 면역 반응을 자극하는 탈개체화 처리 조직의 성향 감소에 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(A) 조직으로부터 생세포 및 기타 세포외 조직 성분을 제거하여 조직 매트릭스를 만들고,

(B) 조직 매트릭스를 세포 부착 인자(cellular adhesion factor)로 처리하여 조직 매트릭스의 표면에 배양 동종이계 또는 자가유래 세포를 부착시키는 것을 촉진하고,

(C) 배양 동종이계 또는 자가유래 세포를 사용하여 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하는 단계를 포함하는 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 이식편 조직이 천연 콜라겐 조직, 심장 판막 조직, 결합 조직 또는 혈관에서 생성되는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 심장 판막 조직이 폐동맥 또는 대동맥 심장 판막 조직인 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 이식편 조직이 비-사람의 조직을 처리하여 생성되고, 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하는데 사용된 세포가 사람의 세포이며, 생성된 조직이 이식시에 실질적으로 비면역원성인 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 섬유아세포 및 섬유아세포 성장 인자의 존재하에 조직 매트릭스를 인큐베이트시켜 조직을 재개체군화 형성하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 섬유아세포가 동종이계 세포인 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 섬유아세포가 안정한 세포주로부터 유도되는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 섬유아세포는 외인성 유전 물질을 사용한 안정한 트랜스펙션 기술로 유전 변형시키는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이며, 조직 이식편 수용체에 대해 실질적으로 비면역원성이 되도록 변형시키는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 10

제5항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이며, 특이성 단백질을 발현하도록 변형시키는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 세포를 용해시키기에 유효한 용액으로 상기 조직을 처리함으로써 생세포를 제거하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 조직 매트릭스를 탈세포화시키고 제한된 면역원성을 갖는 조직 매트릭스를 제공하기에 유효한 효소 뉴클레아제로 조직을 처리하는 단계를 더 포함하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, RNAase A, DNAase I, EcoR I 및 Hind III를 포함하는 군으로부터 선택된 뉴클레아제로 조직을 처리하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 단계(A)가 생세포를 제거하고 제한된 면역원성을 갖는 조직 매트릭스를 제공하기에 유효한 저 이온 강도 용액 및 DNAase I 및 RNAase A 로 상기 조직을 처리하는 것을 포함하며, 세포 조직파편, 가용성 단백질 및 기타 물질은 조직을 세정함으로써 제거하여 이식편 수용체에 대해 항원성인 생조직 성분이 거의 없는 조직 매트릭스를 제공하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 세포 재개체군화 형성 단계동안 조직 매트릭스에 세포 부착을 촉진시키는데 유효한 당단백질 및 글리코스아미노글리칸을 포함하는 세포 부착 인자로 조직 매트릭스를 처리하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 재개체군화 형성 단계 (C)동안 조직 매트릭스에 세포 부착을 촉진시키는데 유효한 생조직과 통상적으로 관련이 있는 1 종 이상의 세포의 단백질을 포함하는 세포 부착 인자로 조직 매트릭스를 처리하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 글리코스아미노글리칸이 헤파린, 헤파린 황산염, 콘드로이틴, 콘드로이틴 황산염, 더마틴 또는 더마틴 황산염이며, 당단백질이 피브로넥틴인 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 생조직이 돼지 유래의 심장 판막 조직인 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 동종이계 또는 자가유래 섬유아세포 및 섬유아세포 성장 인자의 존재하에서 단계 (B)에 따라 처리한 조직 매트릭스를 인큐베이트시켜 판막 조직 매트릭스를 재개체군화 형성함으로써 상기 섬유아세포에 의해 재개체군화 형성되고 다시 활력이 부여되고 이식시에 실질적으로 비면역원성인 이종발생성 판막 이식편을 제공하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 생조직 세포를 제거하고, 효소, 뉴클레아제 또는 뉴클레아제 DNAase I 및 RNAase A로 처리함으로써 판막 조직 매트릭스를 제조하여 조직 매트릭스를 제공하는 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 이식편 조직이 동종이계 또는 이종발생성 이식편 조직인 것인 이식편 조직의 생성 방법.

청구항 22

생조직 공급원의 종과는 다른 종의 이식편 조직 수용체의 면역계와의 적합성을 개선시키기 위한 이종발생성 조직의 처리 방법으로서, 조직 매트릭스에 배양 세포의 차후 부착을 촉진시키는데 유효한 양의 세포 부착 인자를 탈세포화 조직 매트릭스에 적용한 후(이때, 상기 세포 부착 인자는 액체 비히클 내에서 생조직과 통상적으로 관련이 있는 1 종 이상의 세포외 단백질을 포함함), 자가유래 또는 동종이계 세포로 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하여, 세포 재개체군화 형성에 의해 활력이 부여되고 상응하는 천연 조직과 조직학적 및 생화학적으로 유사한 실질적으로 비면역원성이며 생체역학적으로 허용가능한 이식편 또는 이식 조직을 제공하는 단계를 포함하는 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 처리한 생조직이 결합 조직, 심장 조직, 콜라겐성 조직 또는 혈관 조직인 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 부착 인자가 당단백질 및 글리코스아미노글리칸인 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 조직 매트릭스를 이식편 수용체와 면역학적으로 적합성이 있는 섬유아세포로 재개체군화 형성하는 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 섬유아세포는 외인성 유전 물질을 사용한 안정한 트랜스펙션 기술을 이용해 유전적으로 변형시키는 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이며, 이식시에 실질적으로 비면역원성이 되도록 변형시키는 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 상기 섬유아세포가 사람의 세포이며, 특이성 단백질을 발현하도록 변형시키는 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 부착 인자는 더마틴, 더마틴 황산염, 콘드로이틴, 콘드로이틴 황산염, 헤파린 황산염 및 헤파린으로 구성된 군에서 선택된 글리코스아미노글리칸 및 피브로넥틴을 포함하는 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 생조직이 돼지 심장 판막 조직이며, 세포 재개체군화 형성 단계는 영양분을 포함하는 환경하에서 섬유아세포 및 유효량의 섬유아세포 성장 인자의 존재하에 조직 매트릭스를 인큐베이트시켜 실시하는 것인 이종발생성 조직의 처리 방법.

청구항 31

비-사람 콜라겐성 조직, 결합 조직 또는 혈관 조직으로부터의 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법으로서, 천연 조직을 탈세포화시키고 세척하여 세포 및/또는 세포외 항원을 제거한 후, 이식편 또는 이식 조직 수용체에 면역학적으로 허용가능한 섬유아세포의 부착을 촉진시키기에 유효한 헤파린 및 피브로넥틴을 포함하는 부착 인자로 조직 매트릭스를 처리하고; 세포 재개체군화 형성이 상응하는 천연 조직과 조직학적으로 유사한 활력이 부여된 조직을 제공할 때까지 섬유아세포 및 섬유아세포 성장 인자의 존재하에 매트릭스를 인큐베이트시킴으로써 부착 인자로 처리된 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하며; 생성된 이식편 조직은 이식에 기계적, 생화학적 및 면역학적으로 적합한 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 피브로넥틴이 사람의 혈장 피브로넥틴 또는 사람의 조직 피브로넥틴인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 조직이 콜라겐성 조직인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 조직이 결합 조직인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 배양 섬유아세포인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 생조직이 심장 판막 조직이며, 재개체군화 형성된 세포가 사람의 섬유아세포인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 37

제31항에 있어서, 세포 재개체군화 형성 단계 이전의 단계에서 조직 매트릭스를 동결 보존시키는 단계를 더 포함하는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 38

제34항에 있어서, 새로운 면역학적 부위의 생성을 제한하도록 뉴클레아제를 사용한 처리를 비롯한 처리에 의해 생조직을 탈세포화시키는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 39

제31항에 있어서, 헤파린이 피브로넥틴을 조직 매트릭스 부위에 부착시키고, 사람의 염기성 재조합 섬유아세포 성장 인자를 사용하는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 조직 매트릭스가 대동맥 또는 폐동맥 심장 판막 조직인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 41

제31항에 있어서, 섬유아세포가 자가이식성 세포인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 42

제31항에 있어서, 섬유아세포가 동종이계성 세포인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 43

제31항에 있어서, 섬유아세포는 안정한 세포주에서 유도되는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 44

제31항에 있어서, 섬유아세포는 외인성 유전 물질을 사용한 안정한 트랜스펙션 기술에 의해 유전적으로 변형되는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 45

제31항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이고, 이식시에 실질적으로 비면역원성이 되도록 변형시키는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 46

제31항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이며, 특이성 단백질을 발현하도록 변형시키는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 47

제31항에 있어서, 조직이 돼지 또는 소의 조직이며, 부착 매트릭스 인자는 정제된 피브로넥틴 및 헤파린을 포함하고, 재개체군화 형성된 세포는 유효량의 염기성 또는 산성 섬유아세포 성장 인자 존재하의 사람의 섬유아세포이며, 생성된 이식편 조직을 사람에게 이식시켰을때 해로운 면역 반응을 실질적으로 일으키지 않는 이종발생성 이식편인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 48

제31항에 있어서, 조직 매트릭스 제조 단계는 저 이온 강도 용액 및 뉴클레아제로 조직을 처리하는 것을 포함하는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 뉴클레아제의 저 이온 강도 용액이 RNAase A, DNAase I, EcoR I 및 Hind III 군으로부터의 1 종 이상의 원을 포함하는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 50

제31항에 있어서, 이식편 조직은 비-사람의 조직이며, 콜라겐성 조직으로 구성된 군에서 선택되고; 상기 조직을 탈세포화시키고, 생세포를 제거하고 한정된 면역원성을 지니는 조직 매트릭스를 제공하기에 유효한 저 이온 강도 용액 및 DNAase I 및 RNAase A로 처리하는 것을 포함하며; 조직 매트릭스에 대한 섬유아세포 부착을 촉진시키는 조직 매트릭스와 관련이 있는 부위를 제공하기에 유효한 양의 피브로넥틴 및 헤파린 황산염을 포함하는 완충 용액으로 조직 매트릭스를 처리하며; 세포 증식 및 섬유아세포를 사용한 조직 매트릭스의 재개체군화 형성을 촉진시키기에 유효한 양의 섬유아세포 성장 인자의 존재하에 사람의 섬유아세포와 함께 인큐베이트시켜 상기 조직 매트릭스를 재개체군화 형성하는 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 이식편 조직이 돼지 심장 판막 조직인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 섬유아세포가 자가이식성인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 53

제50항에 있어서, 섬유아세포가 동종이계성인 것인 이종발생성 이식편 또는 이식 조직의 생성 방법.

청구항 54

생세포를 제거하는 단계를 포함하는, 이식편 조직에 대한 차후 처리에 적합한 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스 생성 방법으로서, 처리 조직 중에서 차후의 생세포 증식을 억제시키는데 효과적이며 조직내에서 새로운 면역 부위가 생성되는 것을 제한하는데 효과적인 뉴클레아제 및 효소를 포함하는 군에서 선택된 성분으로 조직을 처리하는 것을 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 조직 매트릭스를 탈세포화시키고 제한된 면역원성을 갖는 조직 매트릭스를 제공하기에 유효한 뉴클레아제의 저 이온 강도 용액으로 조직을 처리하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 뉴클레아제의 저 이온 강도 용액이 RNAase A, DNAase I, EcoR I 및 Hind III의 군 중 1 종 이상을 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 사용된 뉴클레아제가 리보뉴클레아제 A 및 데옥시리보뉴클레아제 I인 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 58

제54항에 있어서, 추가의 처리 이전에 조직 매트릭스를 동결 보존시키는 것을 더 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 59

제55항에 있어서, 추가의 처리 이전에 조직 매트릭스를 동결 보존시키는 것을 더 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 조직 또는 조직 매트릭스 또는 둘다를 살균시키는 것을 더 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 61

제54항에 있어서, 제53항에 의한 처리 이전에, 천연 포유동물 조직을 채취하고, 조직을 동결 보존시킨 후, 조직의 동결 보존물로부터 조직을 제거하는 것을 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 조직 매트릭스가 돼지 심장 판막의 매트릭스인 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 심장 판막이 폐동맥 또는 대동맥 심장 판막인 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 64

제54항에 있어서, 탈세포화 처리가 저장성 수용액으로 처리하는 것을 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 저장성 수용액이 세포를 용해시키기에 효과적인 완충 수용액인 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 조직이 돼지 심장 판막 조직인 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 심장 판막이 폐동맥 또는 대동맥 심장 판막인 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 생성된 돼지 심장 판막 매트릭스를 동결 보존시키는 단계를 더 포함하는 것인 실질적으로 비면역원성인 조직 매트릭스의 생성 방법.

청구항 69

사람 또는 포유동물 수용체에서의 이식에 조직학적으로 및 면역학적으로 적절한 돼지 또는 소 판막 조직으로부터의 이종발생성 심장 판막의 생성 방법으로서,

(A) 판막 생조직을 탈세포화시켜 생세포 항원을 실질적으로 포함하지 않는 매트릭스를 제공하며, 새로운 면역 부위의 생성을 제한하도록 처리하고;

(B) 매트릭스에 대한 섬유아세포의 부착을 촉진시키기에 유효한 천연 조직과 통상적으로 관련이 있는 1 종 이상의 세포외 단백질을 포함하는 부착 인자를 판막 조직 매트릭스에 적용하고, 이식편 수용체에게 면역학적으로 허용가능한 섬유아세포 성장 인자의 존재하에 동종이계 또는 자가유래 섬유아세포로 판막 조직 매트릭스를 재개체군화 형성시킴으로써 활력이 부여된 판막 조직을 제공하는 것을 포함하는 이종발생성 심장 판막의 생성 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 심장 판막이 폐동맥 또는 대동맥 심장 판막인 것인 이종발생성 심장 판막의 생성 방법.

청구항 71

사람에 사용하기에 적합한 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법으로서,

(A) 생조직을 탈세포화시킨 후, 돼지 심장 판막 조직 매트릭스를 탈세포화시키고 제한된 면역원성을 갖는 조직 매트릭스를 제공하기에 유효한 효소 또는 뉴클레아제로 처리하여 돼지 심장 판막 조직 매

트릭스를 제공하고;

(B) 유효량의 사람 혈장 피브로넥틴 및 헤파린을 판막 조직 매트릭스에 적용하여 동종이계 또는 자가유래성 섬유아세포의 세포 부착을 촉진시키고;

(C) 사람의 배양 섬유아세포 및 사람의 재조합 섬유아세포 성장 인자를 포함하는 영양 배지 중에서 판막 매트릭스를 인큐베이트시킴으로써 섬유아세포를 사용하여 상기 판막 조직 매트릭스를 재개체군화 형성시키는 것을 포함하는 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 심장 판막이 폐동맥 또는 대동맥 심장 판막인 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 73

제71항에 있어서, 단계 (A)가 생조직을 용해시키고, RNAase A 및 DNAase I로 처리하는 단계를 포함하는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식 편의 생성 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 섬유아세포가 자가유래성 세포인 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 75

제73항에 있어서, 부착 인자를 포함하는 영양 배지 중에 조직 매트릭스를 넣어 부착 인자를 적용하고, 그후 섬유아세포 및 섬유아세포 성장 인자를 사용하여 조직 매트릭스를 포함하는 영양 배지에 유효량으로 첨가함으로써 매트릭스를 재개체군화 형성시키는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 76

제73항에 있어서, 섬유아세포가 동종이계인 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 77

제73항에 있어서, 섬유아세포가 자가유래성인 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 78

제73항에 있어서, 조직 매트릭스를 추가로 처리하기 전에 동결 보존시키는 단계를 더 포함하는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 79

제71항에 있어서, 섬유아세포가 안정한 세포주에서 유도되는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 80

제71항에 있어서, 섬유아세포를 외인성 유전 물질을 사용하는 안정한 트랜스펙션 기술에 의해 유전적으로 변형시키는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 81

제71항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이며, 이식시에 실질적으로 비-면역원성이 되도록 변형시키는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 82

제71항에 있어서, 섬유아세포가 사람의 세포이며, 특이성 단백질을 발현하도록 변형시키는 것인 이식 조직 또는 심장 판막 이식편의 생성 방법.

청구항 83

제1항 내지 제53항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 생성된 이식편 조직 생성물.

청구항 84

제54항 내지 제68항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 생성된 조직 매트릭스.

청구항 85

제73항에 의해 생성된 이종발생성 판막.

청구항 86

제1항에 있어서, 판막 조직이 심장 판막 소편, 상기 판막과 관련된 심근 조직, 상기 판막의 박출면 쪽으로 뻗어 있는 대동맥 도관 또는 심방쪽으로 뻗어 있는 판막의 근인 것인 이식편 조직의 생성

방법.

요약

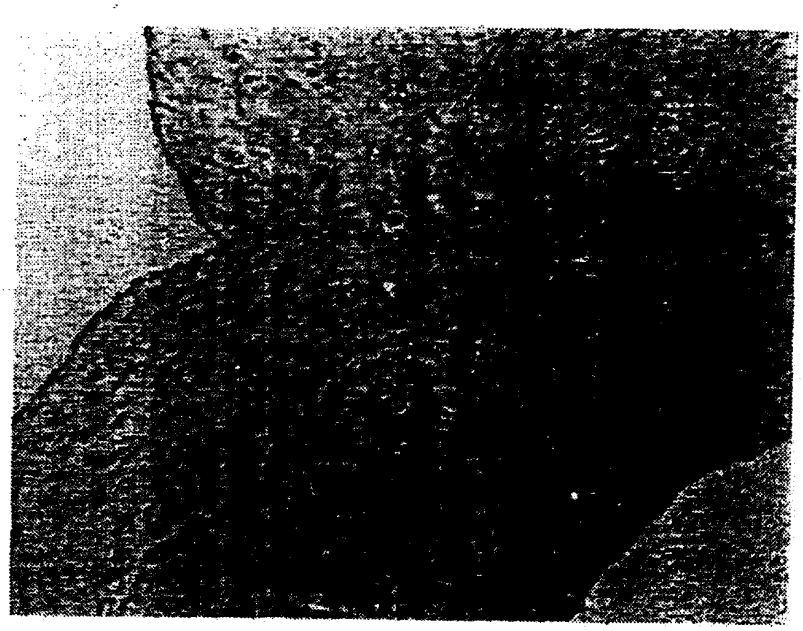
본 발명은 작용성 하이브리드 생물성 인공 삽입물을 생성하기 위한 방법에 관한 것이다. 간질성 콜라겐이 자연적으로 형성된 조직을 처리하여 생세포를 사멸시키고, 잠재적으로 면역학적으로 활성을 갖는 가용성 분자를 제거한다. 그후, 세포외성 매트릭스 유착 인자, 세포외성 매트리스 글리코스아미노글리칸 및 매트릭스내의 작용에 요구되는 세포 유형에 적절한 성장 인자의 순서로 순차적으로 처리하고, 수혜자에 대해 동종이계 또는 자가유래성인 세포로 이식 조직 매트릭스를 배양시킴으로써 선택된 세포 유형 및 조직의 특성을 매트릭스에 부여할 수 있다. 이식편 이식전에 다양한 작용성 생활성을 갖는 조직을 생체내에서 형성시켜 수혜자에 면역 반응의 자극을 감소시키거나 또는 자극을 없앨 수 있다.

대표도

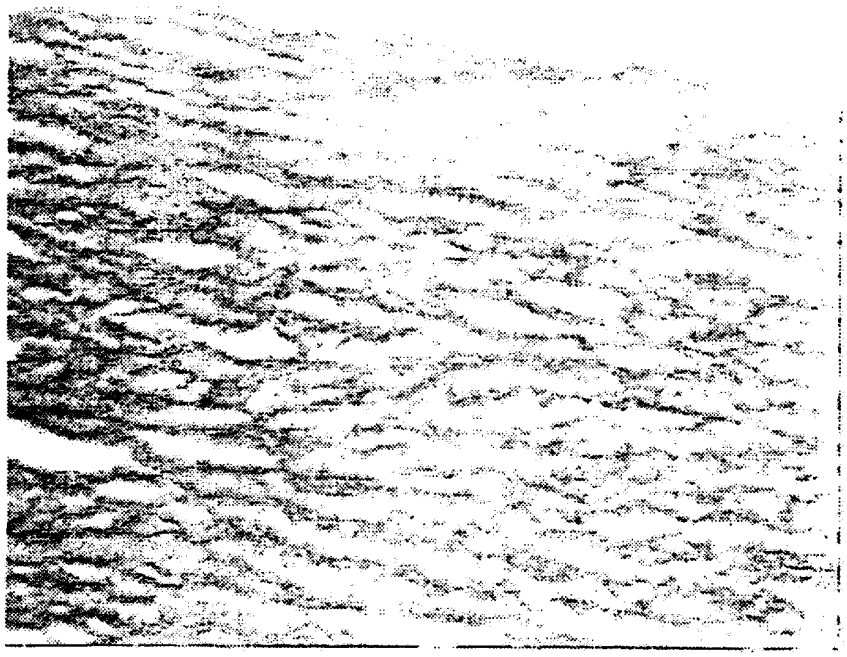
도1

도면

도면1



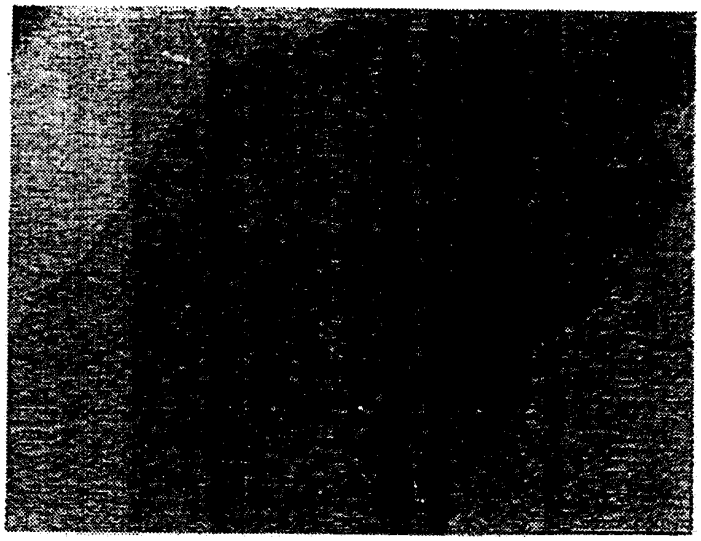
도면2a



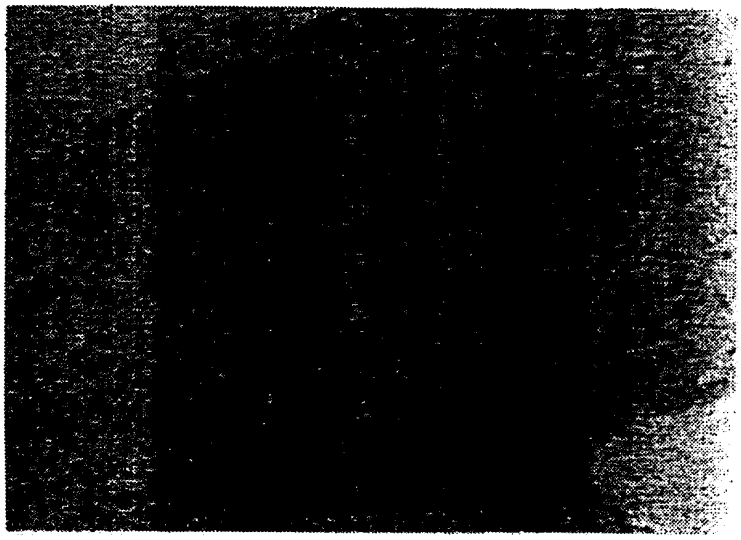
도면2b



도면3a



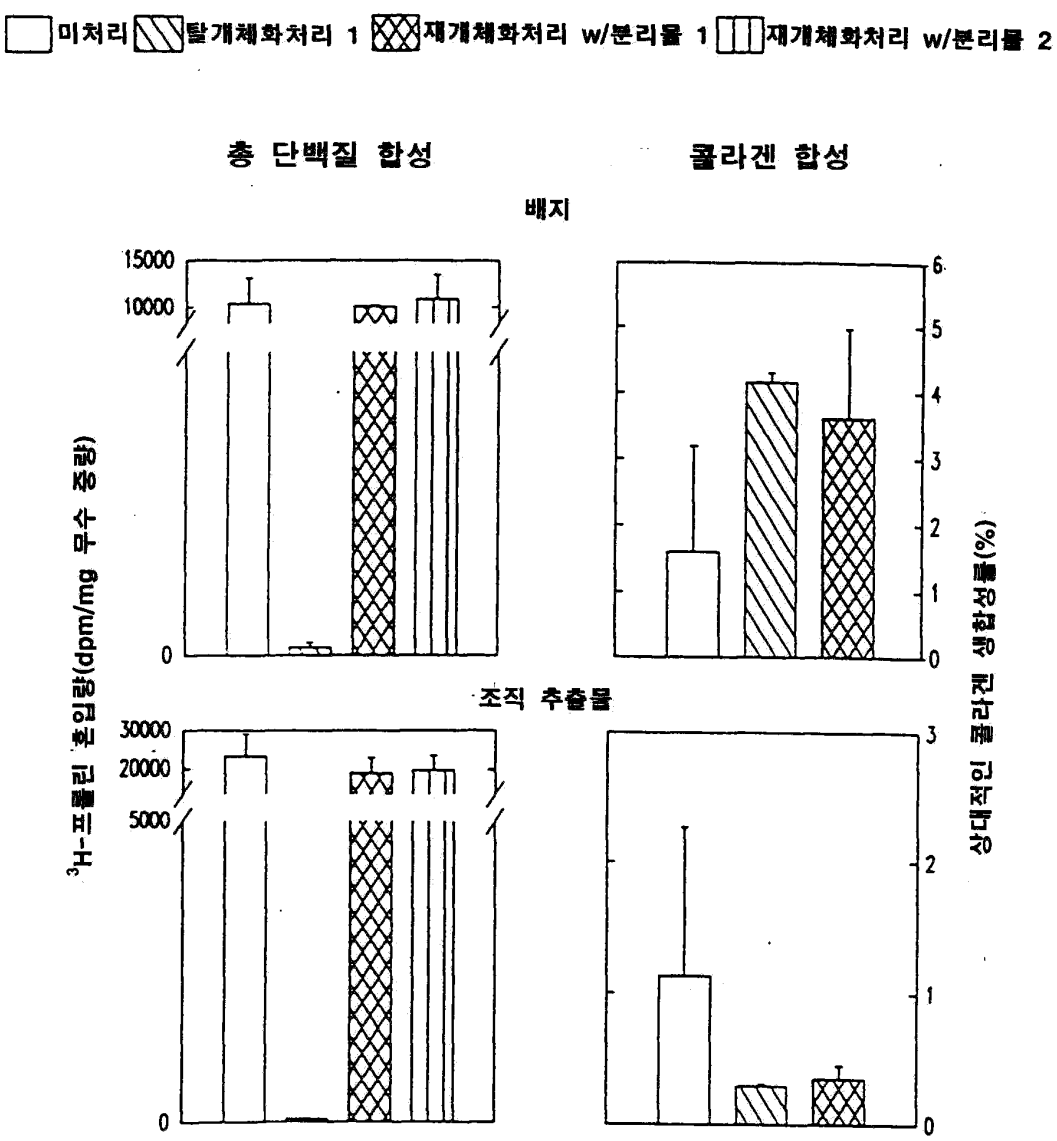
도면3b



도면4

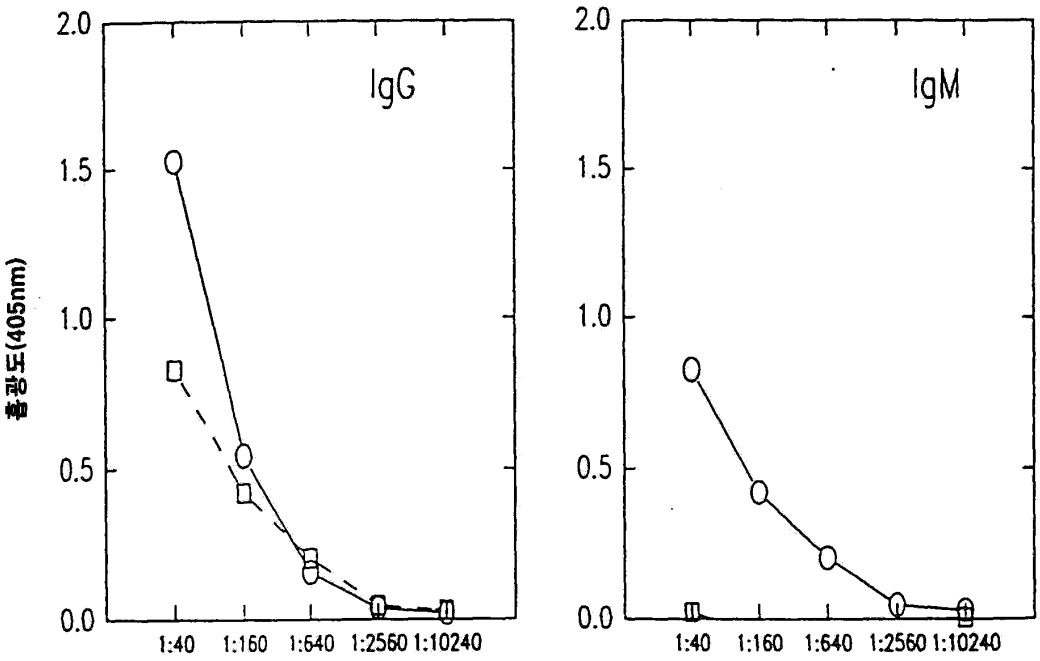
돼지 대동맥 심장 판막 소편에서의 콜라겐 및 비-콜라겐 단백질 형성

미처리,탈개체화처리(무세포성) 대 토끼의 피부 섬유아세포로재개체화처리

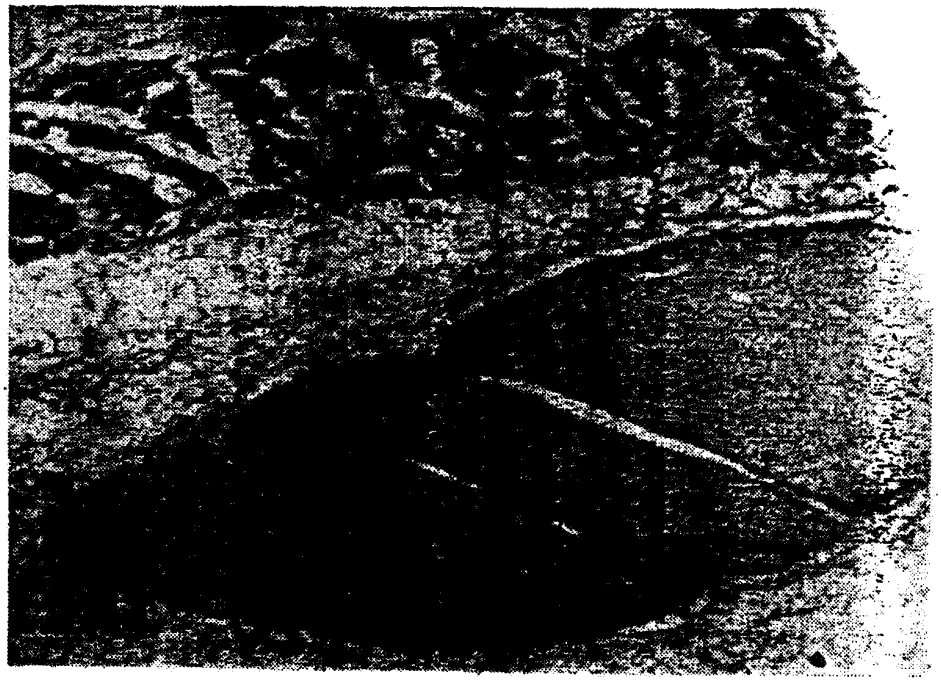


도면5

냉동 보존(○)되거나 또는 탈개체화 처리(□)된 돼지 심장 판막 소편의 추출물-항체 포획물에 대한 사육된 토끼 항혈청의 반응도



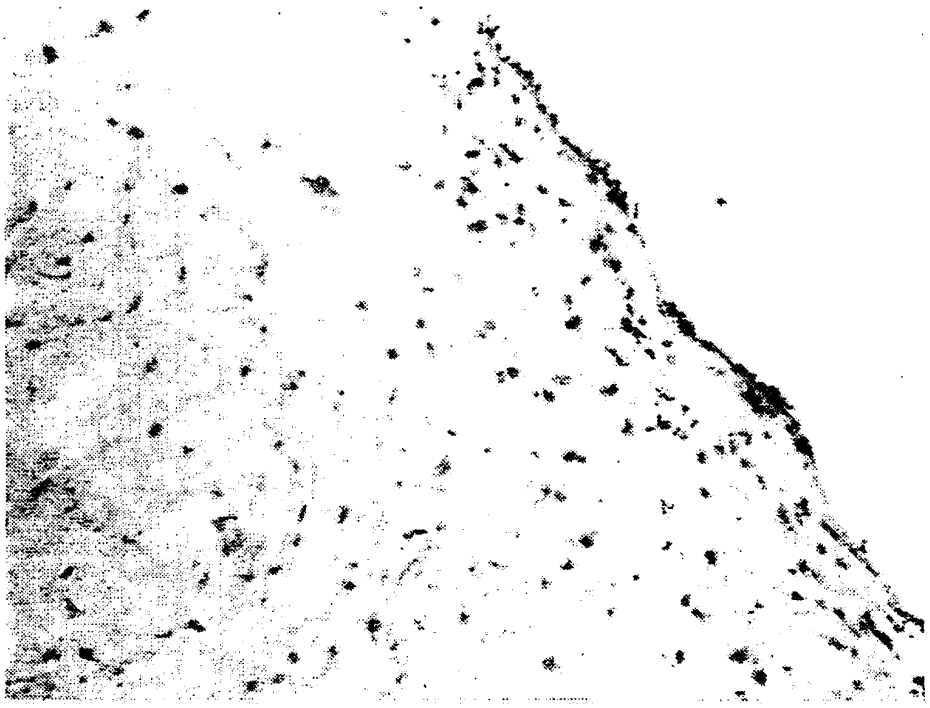
도면6a



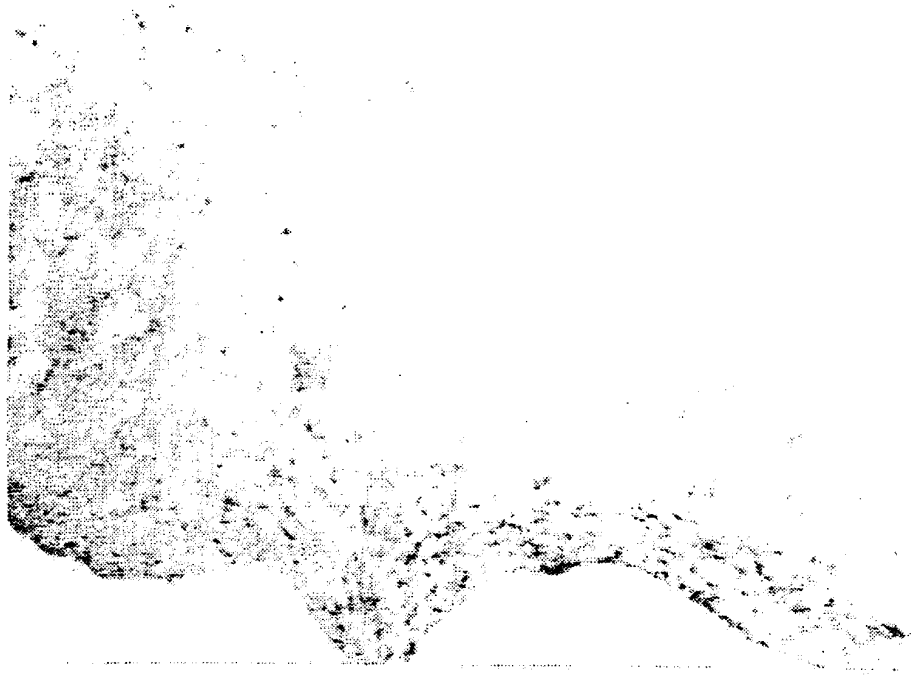
도면6b



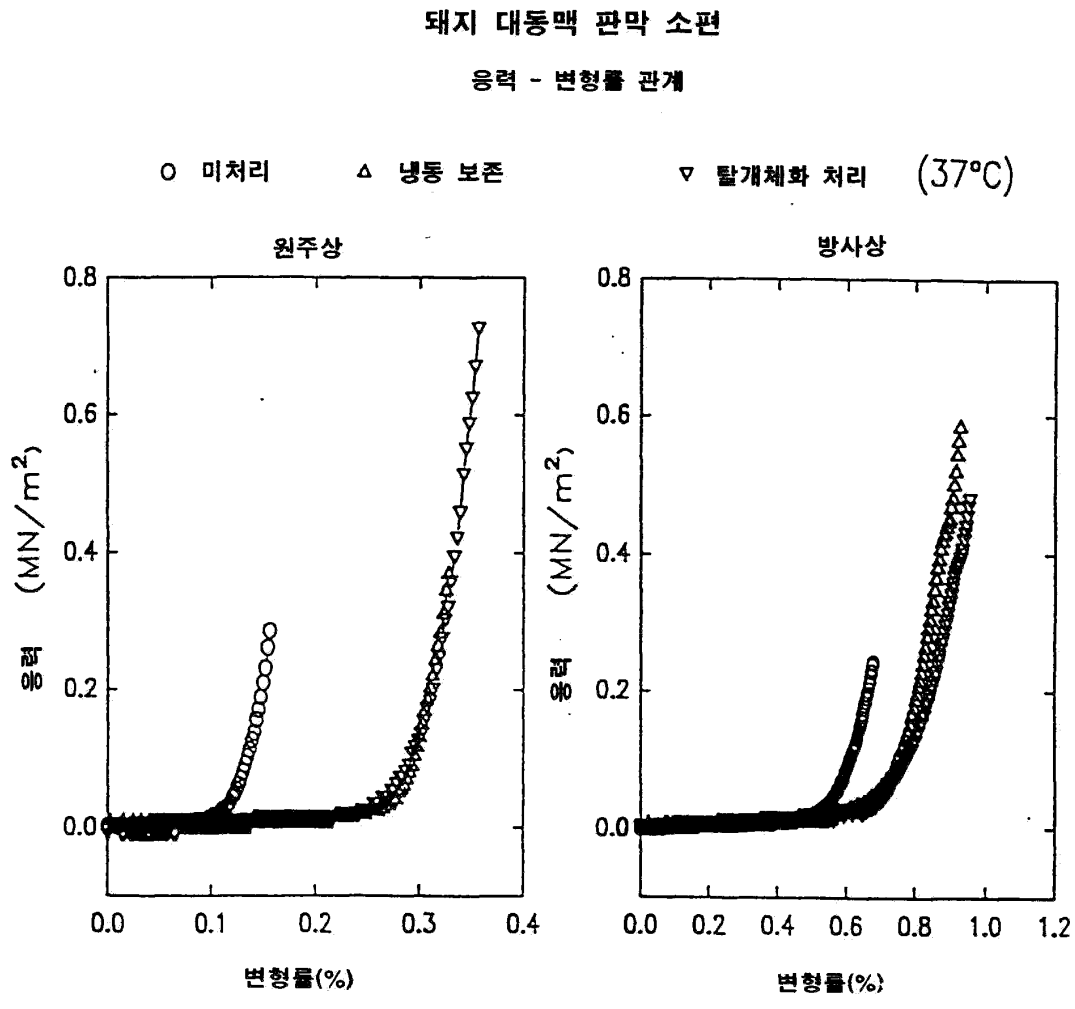
도면7a



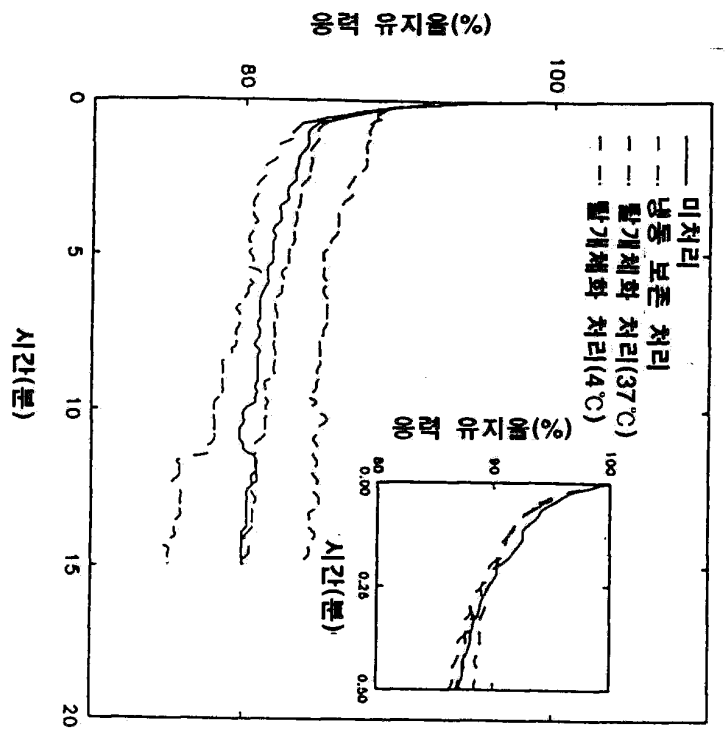
도면7b



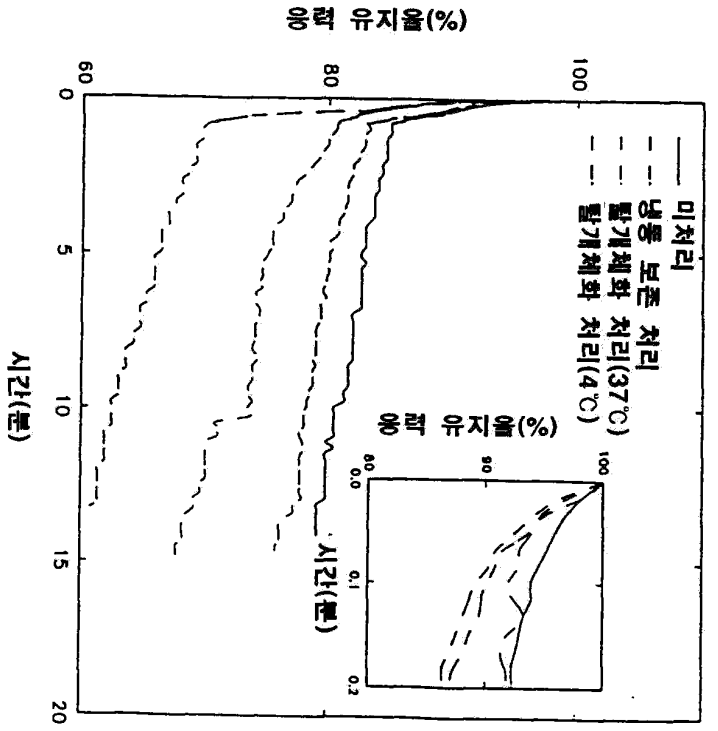
도면8


돼지 대동맥 판막 소편
응력 - 변형률 관계
○ 미처리
△ 냉동 보존
▽ 탈개체화 처리
(37°C)
원주상
방사상
응력 (MN/m²)
변형률(%)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0.1
0.3
1.0
1.2

도면9



돼지 대동맥 소편에서의 응력 이완
냉동 보존 처리 및 탈개체화 처리 효과
원주상 스트립



돼지 대동맥 소편에서의 응력 이완
냉동 보존 처리 및 탈개체화 처리 효과
방사상 스트립

도면10

돼지 대동맥 판막 소편에 대한 인장력 파괴 데이타 냉동 보존 처리 및 탈개체화 처리 효과

원주상 스트립

	미처리	냉동 보존 처리	탈개체화 처리 (37°C)	탈개체화 처리 (4°C)
조직 탄성률	43.8 ± 8.3	35.8 ± 7.0[a]	58.3 ± 7.6[a]	46.0 ± 8.2[a]
최종 인장 강도	7.4 ± 1.6	5.9 ± 1.1[a]	10.7 ± 1.3[a]	9.1 ± 1.5[a]
인성(탄성 에너지)	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.4[a]	2.5 ± 0.5[a]	2.6 ± 0.6[a]
파쇄시의 응력(%)	43.7 ± 4.5	44.2 ± 7.3[a]	57.7 ± 8.1[a]	67.5 ± 5.0[a]

단위 MN/m^2. 평균치 ±SEM. n, 미처리(8), 냉동 보존 처리(8), 37℃에서 탈개체화처리(13) 및 4℃에서탈개체화처리(5) [a] 미처리 조직에 비해 커다란 차이가 없음

방사상 스트립

	미처리	냉동 보존 처리	탈개체화 처리 (37°C)	탈개체화 처리 (4°C)
조직 탄성률	4.9 ± 0.4	5.2 ± 0.9[a]	5.1 ± 1.3[a]	7.7 ± 2.9[a]
최종 인장 강도	0.9 ± 0.07	0.9 ± 0.2[a]	1.2 ± 0.3[a]	1.2 ± 0.2[a]
인성(탄성 에너지)	0.4 ± 0.03	0.6 ± 0.2[a]	1.5 ± 0.3[b]	0.8 ± 0.1[b]
파쇄시의 응력(%)	117 ± 8.7	96.4 ± 11.5[a]	161 ± 26.4[a]	112 ± 41.9[a]

단위 MN/m^2. 평균치 ±SEM. n, 미처리(8), 냉동 보존 처리(5), 37℃에서 탈개체화 처리(7) 및 4℃에서탈개체화처리(3) [b] 미처리 조직에 비해 $p<0.05$에서 커다란 차이가 있음