



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0023626
(43) 공개일자 2012년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/407 (2006.01) *A61K 35/55* (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01) *A61L 27/36* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-7025607
(22) 출원일자(국제) 2010년03월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2011년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/029463
(87) 국제공개번호 WO 2010/120539
국제공개일자 2010년10월21일
(30) 우선권주장
61/211,613 2009년03월31일 미국(US)

(71) 출원인
리전츠 오브 더 유니버스티 오브 미네소타
미국 미네소타 세인트 폴 슈트 160 웨스트케이트
드라이브 1000 (우:55114-8658)
(72) 발명자
테일러, 도리스
미국 55105 미네소타주 세인트 폴 롬바드 애비뉴
929
오트, 하랄드
미국 02118 메사추세츠주 보스턴 #4 워체스터 스
퀘어 34
(74) 대리인
김영, 양영준

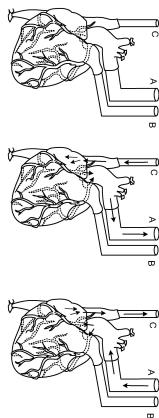
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 기관 및 조직의 탈세포화 및 재세포화

(57) 요 약

본 발명은 기관 또는 그의 일부를 탈세포화시키고, 상기 탈세포화 기관 또는 그의 일부를 재세포화시킴으로써 기관 또는 그의 일부를 생성시키는 방법 및 물질을 제공한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

간의 탈세포화 세포외 매트릭스를 포함하는 탈세포화 간을 제공하며, 상기 세포외 매트릭스는 외부 표면을 포함하고, 혈관 트리를 포함한 상기 세포외 매트릭스는 탈세포화 이전의 상기 세포외 매트릭스의 형태를 실질적으로 유지하고 있으며, 상기 외부 표면은 실질적으로 온전한 것인 단계; 및

상기 탈세포화 간을, 재생 세포가 상기 탈세포화 간 내에서 및 상에서 접목되고, 번식하고/하거나 분화되는 조건 하에 약 40,000개 또는 그 초과의 상기 재생 세포와 접촉시키는 단계

를 포함하는, 간의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 탈세포화 간이 약 2천 3백만 개 또는 그 초과의 재생 세포와 접촉되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 탈세포화 간이 약 3천만 개 또는 그 초과의 재생 세포와 접촉되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 탈세포화 간이 약 3천 5백만 개 또는 그 초과의 재생 세포와 접촉되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 재생 세포가 간세포인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 재생 세포가 간문맥을 통하여 상기 탈세포화 간 내로 주입되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 재생 세포가 탈세포화 간 내로 주사되는 방법.

청구항 8

간 또는 그의 엽 (lobe)-함유 부분의 탈세포화 세포외 매트릭스를 포함하는 탈세포화 간 또는 그의 엽-함유 부분을 제공하며, 상기 세포외 매트릭스는 외부 표면을 포함하고, 혈관 트리를 포함한 상기 세포외 매트릭스는 탈세포화 이전의 상기 세포외 매트릭스의 형태를 실질적으로 유지하며, 상기 외부 표면은 실질적으로 온전한 것인 단계; 및

상기 탈세포화 간의 엽 또는 그의 엽-함유 부분을, 재생 세포가 탈세포화 간 엽 내에서 및 상에서 접목되고, 번식하고/하거나 분화되는 조건 하에 상기 재생 세포 집단과 접촉시키는 단계

를 포함하는, 간 엽의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 재생 세포가 일차 간세포인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 재생 세포가 간문맥을 통하여 상기 엽 내로 주입되는 방법.

청구항 11

기관을 제공하는 단계;

1개 이상의 강 (cavity), 혈관 및/또는 관에서 상기 기관에 캐뉼라를 삽입하여 캐뉼라 삽입된 기관을 생성시키는 단계;

이와 같이 캐뉼라 삽입된 기관을, 상기 1개 이상의 캐뉼라 삽입을 통하여 제1 세포성 봉괴 매질로 관류시키는 단계; 및

상응하는 사체 기관과 비교해서 탈세포화 기간 내에 남아있는 핵산의 양을 결정하는 단계
를 포함하는, 기관을 탈세포화하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 관류 단계가 기관 조직 그램 당 약 2 내지 12시간 동안 수행되는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 관류 단계가, 탈세포화 기관 내에 5% 또는 그 미만의 핵산이 남아있을 때까지 지속되는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 세포성 봉괴 매질이 1% SDS를 포함하는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 관류가 각각의 캐뉼라 삽입된 강, 혈관 및/또는 관으로부터 다중-방향성인 방법.

청구항 16

부신의 탈세포화 세포외 매트릭스를 포함하며, 상기 세포외 매트릭스는 외부 표면을 포함하고, 혈관 트리를 포함한 상기 세포외 매트릭스는 탈세포화 이전의 상기 세포외 매트릭스의 형태를 실질적으로 유지하며, 상기 외부 표면은 실질적으로 온전한 것인, 탈세포화 포유동물 부신.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 기관 및 조직에 관한 것이고, 보다 특히는 기관 및 조직을 탈세포화 및 재세포화하기 위한 방법 및 물질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

생물학적으로 유래된 매트릭스가 조직 공학 및 재생을 위해 개발되었다. 그러나, 현재까지 개발된 매트릭스는 일반적으로, 기능 저하된 매트릭스 구조를 갖고 있고/있거나 기관 또는 조직의 유효한 재구성을 허용해 주는 혈관상 (vascular bed)을 나타내지 못한다. 본 개시내용은 기관 및 조직을 탈세포화 및 재세포화하기 위한 방법을 기재한다.

발명의 내용

[0003]

<발명의 요약>

[0004]

본 개시내용은 기관 또는 조직을 탈세포화하기 위한 방법 및 물질 뿐만 아니라 탈세포화 기관 또는 조직을 재세포화하기 위한 방법 및 물질을 제공한다.

[0005]

한 측면에서는, 탈세포화된 포유동물 심장이 제공된다. 탈세포화된 포유동물 심장에는 외부 표면을 갖는 심장의 탈세포화 세포외 매트릭스가 포함된다. 탈세포화된 심장의 세포외 매트릭스는 탈세포화 이전의 세포외 매트릭스의 형태를 실질적으로 유지하고 있고, 세포외 매트릭스의 외부 표면은 실질적으로 온전하다.

[0006]

대표적인 심장에는 설치류 심장, 돼지 심장, 토끼 심장, 소 심장, 양 심장 또는 개 심장이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 대표적 심장은 인간 심장이다. 탈세포화 심장은 사체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 탈세포화 심장은 전체 심장의 일부이다. 예를 들어, 전체 심장의 일부에는 심장 패치, 대동맥

판막, 승모 판막, 폐동맥 판막, 삼첨 판막, 우심방, 좌심방, 우심실, 좌심실, 중격, 관상 혈관계, 폐동맥 또는 폐정맥이 제한없이 포함될 수 있다.

[0007] 또 다른 측면에서는, 고형 기관이 제공된다. 본원에 기재된 바와 같은 고형 기관에는 상기 언급된 탈세포화 심장 및 이에 부착된 재생 세포 집단이 포함된다. 일부 실시양태에서, 재생 세포는 다능성 세포이다. 일부 실시 양태에서, 재생 세포는 배아 줄기 세포, 제대 세포, 성인 유래 줄기 또는 기원 세포, 골수 유래 세포, 혈액 유래 세포, 중간엽 줄기 세포 (MSC), 골격근 유래 세포, 다분화능 성인 기원 세포 (MAPC), 심장 줄기 세포 (CSC), 또는 다분화능 성인 심장 유래 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 재생 세포는 심장 섬유아세포, 심장 미세혈 관계 세포, 또는 대동맥 내피 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 조직 유래 또는 피부 유래 세포이다.

[0008] 일반적으로, 탈세포화 심장에 부착된 재생 세포의 수는 약 1,000개 이상이다. 일부 실시양태에서, 탈세포화 심장에 부착된 재생 세포의 수는 약 1,000개 세포/mg 조직 (습윤 중량, 즉 탈세포화되기 전의 중량) 내지 약 10,000,000개 세포/mg 조직 (습윤 중량)이다. 일부 실시양태에서, 재생 세포는 탈세포화 심장에 대해 이종이다. 또한 일부 실시양태에서, 고형 기관은 환자 내로 이식해야 하고 재생 세포는 환자에 대해 자기 유래이다.

[0009] 또 다른 측면에서는, 고형 기관의 제조 방법이 제공된다. 이러한 방법은 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같은 탈세포화 심장을 제공하는 단계, 및 상기 탈세포화 심장을, 재생 세포가 탈세포화 심장 내에서 및 상에서 접목되고, 번식하고/하거나 분화되는 조건 하에 재생 세포 집단과 접촉시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 재생 세포는 탈세포화 심장 내로 주사하거나 또는 관류시킨다.

[0010] 또 다른 측면에서는, 심장을 탈세포화하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 심장을 제공하는 단계, 1개 또는 1개 초과의 강, 혈관 및/또는 관에서 심장에 캐뉼라를 삽입하여 캐뉼라 삽입된 심장을 생성시키는 단계, 및 이와 같이 캐뉼라 삽입된 심장을, 1개 또는 1개 초과의 캐뉼라 삽입을 통하여 제1 세포성 봉괴 매질로 관류시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 상기 관류는 각각의 캐뉼라 삽입된 강, 혈관 및/또는 관으로부터 다중-방향성일 수 있다. 전형적으로, 세포성 봉괴 매질은 SDS, PEG, 또는 트리톤 (Triton) X와 같은 하나 이상의 세정제를 포함한다.

[0011] 이러한 방법은 또한, 캐뉼라 삽입된 심장을 1개 초과의 캐뉼라 삽입을 통하여 제2 세포성 봉괴 매질로 관류시키는 단계를 포함할 수 있다. 일반적으로, 제1 세포성 봉괴 매질은 SDS와 같은 음이온성 세정제일 수 있고, 제2 세포성 봉괴 매질은 트리톤 X-100과 같은 이온성 세정제일 수 있다. 이러한 방법에서, 관류 단계는 심장 조직 그램 (습윤 중량) 당 약 2 내지 12시간 동안 수행할 수 있다.

[0012] 한 측면에서는, 고형 기관이 제공된다. 이러한 고형 기관에는 탈세포화 기관 및 이에 부착된 재생 세포 집단이 포함된다. 이러한 탈세포화 기관은 기관의 탈세포화 세포외 매트릭스를 포함하는데, 세포외 매트릭스는 외부 표면을 포함하고, 혈관 트리를 포함한 세포외 매트릭스는 탈세포화 이전의 세포외 매트릭스의 형태를 실질적으로 유지하고 있으며, 외부 표면은 실질적으로 온전하다.

[0013] 대표적인 고형 기관에는 심장, 신장, 간, 또는 폐가 포함된다. 한 실시양태에서, 고형 기관은 간 또는 간의 일부이다. 또 다른 실시양태에서, 고형 기관은 심장 (예: 설치류 심장, 돼지 심장, 토끼 심장, 소 심장, 양 심장 또는 개 심장; 예를 들어, 수축 활성을 나타내는 심장)이다. 대표적인 심장은 인간 심장이다. 심장은 전체 심장의 일부 (예를 들어, 대동맥 판막, 승모 판막, 폐동맥 판막, 삼첨 판막, 우심방, 좌심방, 우심실, 좌심실, 심장 폐치, 중격, 관상 혈관, 폐동맥 및 폐정맥)일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 고형 기관은 신장이다. 본원에 기재된 고형 기관에는 전형적으로, 혈관을 포함한 다중 조직학적 구조가 포함된다.

[0014] 일부 실시양태에서, 탈세포화 기관에 부착된 재생 세포의 수는 약 1,000개 이상이다. 한 실시양태에서, 탈세포화 기관에 부착된 재생 세포의 수는 약 1,000개 세포/mg 조직 내지 약 10,000,000개 세포/mg 조직이다. 재생 세포는 다능성 세포일 수 있다. 또 다른 한편, 재생 세포는 배아 줄기 세포 또는 그의 일부, 제대 세포 또는 그의 일부, 골수 세포 또는 그의 일부, 말초혈 세포 또는 그의 일부, 성인 유래 줄기 또는 기원 세포 또는 그의 일부, 조직 유래 줄기 또는 기원 세포 또는 그의 일부, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 그의 일부, 골격근 유래 줄기 또는 기원 세포 또는 그의 일부, 다분화능 성인 기원 세포 (MAPC) 또는 그의 일부, 심장 줄기 세포 (CSC) 또는 그의 일부, 또는 다분화능 성인 심장 유래 줄기 세포 또는 그의 일부일 수 있다. 재생 세포의 예에는 심장 섬유아세포, 심장 미세혈관계 내피 세포, 대동맥 내피 세포 또는 간세포가 포함된다. 일부 실시양태에서, 재생 세포는 탈세포화 기관에 대해 동종 또는 이종이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 고형 기관은 환자 내로 이식해야 하고 재생 세포는 환자에 대해 자기 유래이다. 다른 실시

양태에서, 고형 기관은 환자 내로 이식해야 하고 탈세포화 기관은 환자에 대해 동종 또는 이종이다.

[0016] 또 다른 측면에서는, 기관의 제조 방법이 제공된다. 이러한 방법은 일반적으로, 탈세포화 기관을 제공하며, 상기 탈세포화 기관은 기관의 탈세포화 세포와 매트릭스를 포함하는데, 세포와 매트릭스는 외부 표면을 포함하고, 혈관 트리를 포함한 세포와 매트릭스는 탈세포화 이전의 세포와 매트릭스의 형태를 실질적으로 유지하고 있으며, 외부 표면은 실질적으로 온전한 것인 단계; 및 상기 탈세포화 기관을, 재생 세포가 탈세포화 기관 내에서 및 상에서 접목되고, 번식하고/하거나 분화되는 조건 하에 재생 세포 접단과 접촉시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 재생 세포는 탈세포화 기관 내로 주사한다. 대표적인 탈세포화 기관에는 심장, 신장, 간, 비장, 췌장 또는 폐가 포함된다.

[0017] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 바와 유사하거나 등가의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 적합한 방법 및 물질이 다음에 기재된다. 또한, 물질, 방법 및 예는 단지 예시적이고, 제한적이지 않다. 본원에서 언급된 모든 공개 공보, 특히 출원, 특히 및 기타 참조 문헌은 그의 전문이 참고로 포함된다. 상반되는 경우, 본 명세서 (정의 포함)가 조절할 것이다.

[0018] 본 발명의 한 가지 이상의 실시양태의 상세 내역이 첨부되는 도면 및 다음 설명에 제시된다. 본 발명의 기타 특징, 목적 및 이점은 도면 및 상세한 설명, 및 특허청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 심장의 탈세포화를 위한 초기 제조를 나타내는 도식이다. 대동맥, 폐동맥, 및 상위 대정맥에 캐뉼라를 삽입하였고 (각각 A, B, C), 하위 대정맥, 왼두 동맥 (brachiocephalic artery), 좌측 총 경동맥, 및 좌측 쇄골하 동맥을 결찰시켰다. 화살표는 전진 (antegrade) 및 역행 (retrograde)에서의 관류 방향을 표시한다.

도 2는 탈세포화/재세포화 장치의 한 실시양태를 도식으로 나타낸 것이다.

도 3a는 탈세포화되는 간 및 신장의 사진이고, 도 3b는 탈세포화되는 심장 및 폐의 사진이다. 좌측의 사진은 조직의 조직학 염색을 나타내고 사체 기관에 남아있는 혁산의 정량화를 기재하는 반면, 우측의 사진은 탈세포화 매트릭스의 조직학 염색 및 관류-탈세포화 기관 내에 남아있는 혁산의 정량화를 나타낸다.

도 4는 관류 탈세포화 폐지 신장 (좌측) 및 래트 신장 [중앙; 삽입도면은 에반스 블루 (Evans blue) 염료를 이용한 관류를 나타낸다]의 사진, 및 관류 탈세포화 후 접합관 및 세관에 둘러싸인 사구체의 EM 사진을 도시한 것이다.

도 5는 하부 복부에서부터 두부까지 탈세포화된 전체 래트의 사진이다.

도 6은 간의 재세포화를 보여주는 사진이다. 도 6a는 관류 탈세포화 래트 간을 도시한 것이고; 도 6b는 간문맥 카테터를 통하여 탈세포화 래트 간의 단일 엽 내로 1차 간세포의 주사를 도시한 것이다.

도 7은 재세포화가 표적이 될 수 있다는 것을 보여주는 사진이다. 도 7a는 탈세포화 간의 꼬리엽으로 전달되는 일차 래트 간세포를 도시한 것이고; 도 7b는 탈세포화 래트 간의 하위/상위 우측 외측엽으로 전달되는 일차 래트 간세포를 도시한 것이다.

도 8은 탈세포화 래트 간의 재세포화를 나타내는 SEM 사진이다. 4천만 개의 일차 래트 간세포가 간문맥을 통하여 전달되었고, 1주 동안 배양하였다 (a-d).

도 9는 일차 래트 간세포를 꼬리 돌기 내로 주사한지 1주 후에 재세포화 래트 간의 염색을 도시한 것이다. 도 9a는 매송 (Masson) 삼색 염색을 도시한 것이고 (10X); 도 9b는 H&E 염색을 도시한 것이다 (10X).

도 10은 꼬리 돌기 내로 일차 래트 간세포를 이용하여 재세포화한지 1주 후에 간의 TUNEL 분석을 도시한 것이다. 도 10a는 살아있는 세포와 세포소멸성 세포의 혼합을 보여주는 TUNEL 염색이고 (10X); 도 10b는 매송 삼색 염색이다 (10X).

도 11은 시험관 내에서 관류 탈세포화 래트 간에서의 1주 후 인간 HepG2 세포의 매송 삼색 염색을 도시한 것이다. 도 11a는 꼬리 돌기를 도시한 것이고; 도 11b는 상위/하위 우측 외측엽을 도시한 것이다. 둘 다 10X 하에 서이다; V는 매트릭스 내의 혈관이다.

도 12는 세포 체류 효율의 그래프이다. 이 그래프는 일차 래트 간세포 (1-6) 또는 HepG2 (7 및 8) 세포가 주사

후에 유지된다는 것을 나타낸다. 세포를 주사 전 및 후에 계수하였다. 초기 수 - 유지된 세포를 기초로 하여 체류율 (%)을 계산하였다.

도 13은 HepG2 세포가 탈세포화 기관 내에 여전히 살아있다는 것을 보여주는 그래프이다. 알라마르 블루 (Alamar blue) 대사는 HepG2 세포 (주사 당일 약 3천만 개)가 꼬리 돌기 (다이아몬드) 및 상위/하위 우측 외측 엽 (사각형) 대로 주사한 후에도 여전히 살아있고 제한된 정도로 증식하였다는 것을 입증해준다.

도 14는 재세포화 후 일차 래트 간세포에 의한 우레아 생성의 시간 과정을 도시하는 그래프이다 (7일 동안 대략 3천 5백만개 세포).

도 15는 재세포화 후 일차 래트 간세포에 의한 매일 일부민 생성의 시간 과정을 도시하는 그래프이다 (7일 동안 대략 3천 5백만개 세포).

도 16은 꼬리엽에 주사된 일차 래트 간세포로부터의 에톡시레소루핀-0-데에틸라제 (EROD) 활성의 시간 과정을 도시하는 그래프이다 (8일 동안 2천 3백만개 세포).

도 17은 배아 및 성인 유래 줄기/기원 세포가 탈세포화 심장, 폐, 간 및 신장 상에서 3주 이상 동안 증식되었다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 18은 마우스 배아 줄기 세포 (mESC) 및 증식성 성인 줄기 세포 (골격 근육모세포; SKMB)가 탈세포화 심장, 폐, 간 및 신장 상에 살아있었다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 19는 사체 심장 (좌측 패널) 및 탈세포화 심장 (우측 패널)의 SEM 사진이다. LV, 좌심실; RV, 우심실.

도 20은 사체 래트 간 (좌측 패널) 및 재세포화 래트 간 (우측 패널)의 조직학적 (상부 패널) 및 SEM (바닥 패널) 비교이다.

도 21은 (a) 완전히 탈세포화된 돼지 간 매트릭스를 나타내는 사진, 및 (b) 혈관 도관 및 (c) 실질 매트릭스 완전성을 나타내는 관류 탈세포화 돼지 간의 SEM이다.

도 22는 침지 탈세포화 간의 총괄 전망을 나타내는 사진이다. 온전한 간의 총체적 외관에도 불구하고, 매트릭스의 많아 해어짐과 캡슐의 손실이 저 배율 (a) 및 고 배율 (b) 둘 다에서 관찰될 수 있다.

도 23은 침지 탈세포화 후 (a 및 b), 기관에 글리송 (Glisson) 캡슐이 결여된 반면, 1% SDS 관류 탈세포화 후에는 (c 및 d), 기관에 상기 캡슐이 유지되었다는 것을 보여주는 SEM 사진이다.

도 24는 침지 탈세포화 래트 간의 조직학 (a, H&E; b, 삼색) 및 1% SDS 관류 탈세포화 후의 조직학 (c, H&E; d, 삼색)을 보여주는 사진이다.

도 25는 래트 심장의 침지 탈세포화 (상부 열)와 관류 탈세포화 (바닥 열) 간의 비교를 나타내는 사진이다. 좌측 칼럼, 전체 기관; 중간 칼럼, H&E 조직 염색; 우측 칼럼, SEM.

도 26은 래트 심장을 이용한 침지 탈세포화 (상부 열)와 관류 탈세포화 (바닥 열) 간의 비교를 나타내는 사진이다. 좌측 칼럼, 전체 기관; 중간 칼럼, H&E 조직 염색; 우측 칼럼, SEM.

도 27은 관류-탈세포화 심장 (도 27a) 및 침지-탈세포화 심장 (도 27b)의 SEM 사진이다.

도 28은 관류-탈세포화 심장 (도 28a) 및 침지-탈세포화 심장 (도 28b)의 SEM 사진이다.

도 29는 침지-탈세포화 간의 SEM 사진이다.

각종 도면에서의 유사 참조 부호는 유사 요소를 표시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

<상세한 설명>

[0021]

고형 기관은 일반적으로, 3가지 주요 성분, 즉 세포외 매트릭스 (ECM), 이 안에 봉매된 세포, 및 혈관계상을 갖는다. 본원에 기재된 바와 같은 고형 기관의 탈세포화는 대부분 또는 모든 세포성 성분을 제거하는 반면, 세포외 매트릭스 (ECM)와 혈관계상은 실질적으로 보존하고 있다. 이때, 탈세포화 고형 기관을 재세포화를 위한 스캐폴드 (scaffold)로서 사용할 수 있다. 고형 기관을 수득할 수 있는 포유류에는 설치류, 돼지, 토끼, 암소, 양, 개 및 인간이 제한없이 포함된다. 본원에 기재된 방법에 사용된 기관 및 조직은 사체일 수 있거나, 또는

태아, 신생아 또는 성인의 것일 수 있다.

[0022] 본원에 지칭된 바와 같은 고형 기관에는 심장, 간, 폐, 콜격근, 뇌, 혀, 비장, 신장, 위, 자궁 및 방광이 제한없이 포함된다. 본원에 사용된 바와 같은 고형 기관은 "실질적으로 밀폐된" 혈관계 시스템을 갖는 기관을 지칭한다. 기관과 관련하여 "실질적으로 밀폐된" 혈관계 시스템은 액체를 이용한 관류시, 대다수의 액체가 고형 기관 내에 함유되어 있고, 고형 기관으로부터 누출되지 않아, 주 혈관이 캐뉼라 삽입되거나, 결찰되거나 또는 달리 제한되는 것으로 추정되는 것을 의미한다. "실질적으로 밀폐된" 혈관계 시스템을 가짐에도 불구하고, 상기 열거된 많은 고형 기관은 관류 동안 기관 전반에 걸쳐 액체를 도입하고 이동시키는 데 유용한 규정된 "유입" 및 "배출" 혈관을 갖고 있다.

[0023] 상기 언급된 고형 기관 이외에도, 기타 유형의 혈관화 기관 또는 조직, 예를 들어 관절 (예: 무릎, 어깨, 엉덩이 또는 척추), 기도, 폐부, 장간막 또는 창자, 소장 및 대장, 식도, 난소, 음경, 고환, 척수, 또는 단일 또는 분지된 혈관의 전부 또는 일부를 본원에 기재된 방법을 이용하여 탈세포화시킬 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 방법을 또한 사용하여, 비혈관성 (또는 비교적 비혈관성) 조직, 예를 들어 연골 또는 각막을 탈세포화시킬 수 있다.

[0024] 재세포화를 수반하거나 수반하지 않은, 본원에 기재된 바와 같은 탈세포화 기관 또는 조직 (예: 심장 또는 간) 또는 그의 모든 일부 (예: 대동맥 판막, 승모 판막, 폐동맥 판막, 삼첨 판막, 폐정맥, 폐동맥, 관상 혈관계, 종격, 우심방, 좌심방, 우심실, 좌심실 또는 간엽)를 환자 내로의 이식에 사용할 수 있다. 또 다른 한편, 본원에 기재된 바와 같은 재세포화 기관 또는 조직을 사용하여, 예를 들어 기관 또는 조직의 세포성 구성 및/또는 분화를 진행하고 있는 세포를 조사할 수 있다.

기관 또는 조직의 탈세포화

[0026] 본 발명은 포유동물 기관 또는 조직을 탈세포화하기 위한 방법 및 물질을 제공한다. 기관 또는 조직을 탈세포화하는 데에 있어서의 초기 단계는 가능한 경우, 기관 또는 조직에 캐뉼라를 삽입하는 것이다. 기관 또는 조직의 혈관, 관 및/또는 강은 당해 분야에 공지된 방법 및 물질을 이용하여 캐뉼라 삽입할 수 있다. 기관 또는 조직을 탈세포화하는 데에 있어서의 그 다음 단계는 이와 같이 캐뉼라 삽입된 기관 또는 조직을 세포성 봉괴 매질로 관류시키는 것이다. 기관을 통한 관류는 다중-방향성일 수 있다 (예를 들어, 전진 및 역행).

[0027] 심장의 랑겐도르프 (Langendorff) 관류가 당해 분야에서 통상적인데, 이는 생리학적 관류 (4 챔버 작동 방식 관류로서 공지되기도 함)이기 때문이다 (예를 들어, 문헌 [Dehnert, *The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff*, In *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology: Biological Measurement Techniques V*. Biomesstechnik-Verlag March GmbH, West Germany, 1988] 참조). 간략하게 언급하면, 랑겐도르프 관류의 경우에는, 대동맥에 캐뉼라를 삽입하고, 이를 세포성 봉괴 매질 함유 저장고에 부착시킨다. 세포성 봉괴 매질은, 예를 들어 주입 또는 롤러 펌프에 의해 절단되거나 또는 일정 수압에 의해 전달된 일정 유속 하에서 대동맥 아래로 역행 방향으로 전달될 수 있다. 양 경우에 있어, 대동맥 판막이 강제로 닫히고 관류 유체가 관상 동맥구 내로 향하는데 (이로써 심장의 전체 심실 뎅어리를 관류시킨다), 어어서 관상 부비강을 통하여 우심방 내로 배수된다. 작동 방식 관류의 경우에는, 제2 캐뉼라를 좌심방에 연결시키고, 관류를 역행에서부터 전진으로 변화시킬 수 있다.

[0028] 다른 기관 또는 조직을 관류시키는 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 다음 참고 문헌에는 폐, 간, 신장, 뇌 및 사지의 관류가 기재되어 있다 (문헌 [Van Putte et al., 2002, *Ann. Thorac. Surg.*, 74(3):893-8]; [den Butter et al., 1995, *Transpl. Int.*, 8:466-71]; [Firth et al., 1989, *Clin. Sci. (Lond.)*, 77(6):657-61]; [Mazzetti et al., 2004, *Brain Res.*, 999(1):81-90]; [Wagner et al., 2003, *J. Artif Organs*, 6(3):183-91] 참조).

[0029] 하나 이상의 세포성 봉괴 매질을 사용하여 기관 또는 조직을 탈세포화시킬 수 있다. 세포성 봉괴 매질에는 일반적으로, 하나 이상의 세정제, 예컨대 SDS, PEG, 또는 트리톤 X가 포함된다. 세포성 봉괴 매질에는 물이 포함될 수 있으므로, 이러한 매질은 삼투압적으로 세포와 비-흔화성이다. 또 다른 한편, 세포성 봉괴 매질에는 세포와의 삼투압 혼화성을 위한 완충제 (예: PBS)가 포함될 수 있다. 세포성 봉괴 매질에는 또한, 효소, 비제한적으로 예를 들어 하나 이상의 콜라제나제, 하나 이상의 디스파제, 하나 이상의 DNase, 또는 프로테아제 (예: 트립신)가 포함될 수 있다. 일부 경우에, 세포성 봉괴 매질에는 또한 또는 또 다른 한편으론, 하나 이상의 효소의 억제제 (예: 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제 및/또는 콜라제나제 억제제)가 포함될 수 있다.

[0030] 특정 실시양태에서, 캐뉼라 삽입된 기관 또는 조직은 2개의 상이한 세포성 봉괴 매질로 순차적으로 관류시킬 수

있다. 예를 들어, 제1 세포성 봉괴 매질에는 음이온성 세정제 (예: SDS)가 포함될 수 있고, 제2 세포성 봉괴 매질에는 이온성 세정제 (예: 트리톤 X-100)가 포함될 수 있다. 하나 이상의 세포성 봉괴 매질로 관류시킨 후, 캐뉼라 삽입된 기관 또는 조직을, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 효소를 함유하는 용액 및/또는 세척 용액으로 관류시킬 수 있다.

[0031] 관류의 방향을 교대시키는 것이 (예를 들어, 전진 및 역행) 전체 기관 또는 조직을 효과적으로 탈세포화시키는 데에 도움을 줄 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 탈세포화는 본질적으로, 뒤집힌 것으로부터 기관을 탈세포화시켜, ECM에 대한 손상이 극히 없게 한다. 기관 또는 조직은 4 내지 40°C의 적합한 온도 하에 탈세포화시킬 수 있다. 기관 또는 조직의 크기 및 중량, 및 세포성 봉괴 매질 중의 특별한 세정제(들) 및 세정제(들)의 농도에 따라서, 기관 또는 조직은 일반적으로, 세포성 봉괴 매질을 이용하여 고형 기관 또는 조직 그램 당 약 2 내지 약 12시간 동안 관류시킨다. 세척을 포함하여, 기관은 조직 1 그램 당 약 12 내지 약 72시간 이하 동안 관류시킬 수 있다. 관류는 일반적으로, 박동 혈류, 속도 및 압력을 포함한 생리학적 조건에 맞도록 조정한다.

[0032] 본원에 표시된 바와 같이, 탈세포화 기관 또는 조직은 본질적으로, 기관 또는 조직의 모든 또는 대부분 영역의 세포외 매트릭스 (ECM) 성분 (혈관 트리의 ECM 성분 포함)으로 이루어진다. ECM 성분에는 다음 성분들 중의 어느 것 또는 전부가 포함될 수 있다: 피브로네틴, 피브릴린, 라미닌, 엘라스틴, 콜라겐 계열의 구성원 (예: 콜라겐 I, III 및 IV), 글리코사미노글리칸, 접지 물질, 망상 섬유 및 트롬보스폰딘 (이들은 여전히 기저판과 같은 규정된 구조로서 구성될 수 있다). 성공적인 탈세포화는 표준 조직학적 염색 과정을 이용하여 조직학적 박편 내에 탐지 가능한 근육미세섬유, 내피 세포, 평활근 세포, 및 핵이 부재하는 것으로서 정의된다. 반드시는 아니지만 바람직하게는, 잔류성 세포 부스러기를 또한, 탈세포화 기관 또는 조직으로부터 제거하였다.

[0033] 기관 또는 조직을 효과적으로 재세포화 및 생성시키기 위해서는, 탈세포화 공정 동안 및 공정 후에 ECM의 형태 및 구조가 유지되어야 하는 것 (즉, 실질적으로 온전한 상태로 유지되는 것)이 중요하다. 본원에 사용된 바와 같은 "형태"는 기관 또는 조직의 전반적인 외형 또는 ECM의 전반적인 외형을 지칭하는 반면, 본원에 사용된 바와 같은 "구조"는 외부 표면, 내부 표면, 및 그들 사이의 ECM을 지칭한다.

[0034] ECM의 형태 및 구조는 가시적 및/또는 조직학적으로 조사할 수 있다. 예를 들어, 고형 기관의 외부 표면 상의 기저판, 또는 기관 또는 조직의 혈관계 내의 기저판은 탈세포화로 인해 제거되지 않아야 하거나 상당히 손상되지 않아야 한다. 또한, ECM의 원섬유는 탈세포화시키지 않은 기관 또는 조직의 것과 유사하거나 상당히 변화되지 않아야 한다. 달리 표시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 탈세포화는 관류 탈세포화를 지칭하고, 달리 표시하지 않는 한, 본원에 지칭된 탈세포화 기관 또는 매트릭스는 본원에 기재된 관류 탈세포화를 이용하여 수득한다. 본원에 기재된 바와 같은 관류 탈세포화는, 예를 들어 미국 특허 제6,753,181호 및 제6,376,244호에 기재된 바와 같은 침지 탈세포화와 비교할 수 있다.

[0035] 하나 이상의 화합물을 탈세포화 기관 또는 조직 내에 또는 상에 적용하여, 예를 들어 탈세포화 기관을 보존하거나, 또는 재세포화용의 탈세포화 기관 또는 조직을 제조하고/하거나 재세포화 공정 동안 세포를 지원 또는 자극할 수 있다. 이러한 화합물에는 하나 이상의 성장 인자 (예: VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF, 및 HGF), 면역 조정제 (예: 사이토킨, 클루코코르티코이드, IL2R 길항제, 류코트리엔 길항제), 및/또는 응고 케스케이드를 조절하는 인자 (예: 아스파린, 헤파린-결합성 단백질 및 헤파린)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 탈세포화 기관 또는 조직을, 예를 들어 방사선 조사 (예: UV, 감마)로 추가로 처리하여 탈세포화 기관 또는 조직 상에 또는 내에 잔존하는 모든 유형의 미생물의 존재를 없애거나 감소시킬 수 있다.

기관 또는 조직의 재세포화

[0037] 본 발명은 기관 또는 조직을 생성시키기 위한 물질 및 방법을 제공한다. 기관 또는 조직은 본원에 기재된 바와 같은 탈세포화 기관 또는 조직을 재생 세포 집단과 접촉시킴으로써 생성시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 재생 세포는 탈세포화 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해 사용된 모든 세포이다. 재생 세포는 분화전능성 세포, 다능성 세포, 또는 다분화능 세포일 수 있고, 비-수임 또는 수임 세포일 수 있다. 재생 세포는 또한, 단일-계보 세포일 수 있다. 또한, 재생 세포는 미분화된 세포, 부분적으로 분화된 세포, 또는 완전히 분화된 세포일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 재생 세포에는 배아 줄기 세포 (국립 보건 연구소 (NIH)에 의해 정의된 바와 같음; 예를 들어, [the Glossary at stemcells.nih.gov on the World Wide Web] 참조)가 포함된다. 재생 세포에는 또한, 기원 세포, 전구체 세포, 및 "성인"-유래 줄기 세포 (제대 세포 및 태아 줄기 세포 포함)가 포함된다.

[0038] 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해 사용될 수 있는 재생 세포의 예에는 배아 줄기 세포, 제대혈 세포, 조직-

유래 줄기 또는 기원 세포, 골수-유래 줄기 또는 기원 세포, 혈액-유래 줄기 또는 기원 세포, 지방세포 조직-유래 줄기 또는 기원 세포, 중간엽 줄기 세포 (MSC), 골격근-유래 세포, 또는 다분화능 성인 기원 세포 (MAPC)가 제한없이 포함된다. 사용될 수 있는 부가의 재생 세포에는 조직-특이적 줄기 세포, 예를 들어 심장 줄기 세포 (CSC), 다분화능 성인 심장-유래 줄기 세포, 심장 섬유아세포, 심장 미세혈관계 내피 세포, 또는 대동맥 내피 세포가 포함된다. 골수-유래 줄기 세포, 예컨대 골수 단핵 세포 (BM-MNC), 내피 또는 혈관 줄기 또는 기원 세포, 및 말초혈-유래 줄기 세포, 예컨대 내피 기원 세포 (EPC)가 재생 세포로서 사용될 수도 있다.

[0039]

기관 또는 조직을 생성시키기 위해 탈세포화 기관 내로 및 상으로 도입되는 재생 세포의 수는 기관 (예를 들어, 어느 기관, 기관의 크기 및 중량) 또는 조직과 재생 세포의 유형 및 발생 단계 둘 다에 좌우된다. 상이한 유형의 세포는 이들 세포가 도달하게 될 집단 밀도에 관해서 상이한 경향을 나타낼 수 있다. 유사하게, 상이한 기관 또는 조직은 상이한 밀도에서 재세포화될 수 있다. 예를 들어, 탈세포화 기관 또는 조직은 약 1,000개 이상 (예를 들어, 10,000, 100,000, 1,000,000, 10,000,000, 또는 100,000,000개 이상) 재생 세포로 "시딩"될 수 있거나; 또는 약 1,000개 세포/mg 조직 (습윤 중량, 즉 탈세포화 이전의 중량) 내지 약 10,000,000개 세포/mg 조직 (습윤 중량)이 이에 부착될 수 있다.

[0040]

재생 세포는 하나 이상의 위치 내로의 주사에 의해 탈세포화 기관 또는 조직 내로 도입 ("시딩")될 수 있다. 또한, 한 가지 초과의 세포 (즉, 세포 칵테일)를 탈세포화 기관 또는 조직 내로 도입할 수 있다. 예를 들어, 세포 칵테일을 탈세포화 기관 또는 조직 내의 다수 위치에서 주사할 수 있거나, 또는 상이한 세포 유형을 탈세포화 기관 또는 조직의 상이한 부분 내로 주사할 수 있다. 또 다른 한편, 또는 주사에 덧붙여, 재생 세포 또는 세포 칵테일은 캐뉼라 삽입된 탈세포화 기관 또는 조직 내로 관류함으로써 도입할 수 있다. 예를 들어, 재생 세포는 관류 매질을 이용하여 탈세포화 기관 내로 관류한 다음, 팽창 및/또는 분화 매질로 변화시켜 재생 세포의 성장 및/또는 분화를 유도시킬 수 있다.

[0041]

재세포화 동안, 기관 또는 조직을, 재생 세포의 적어도 일부가 탈세포화 기관 또는 조직 내에서 및 상에서 번식 및/또는 분화할 수 있는 조건 하에 유지시킨다. 이를 조건에는 적당한 온도 및/또는 압력, 전기적 및/또는 기계적 활성, 힘, 적당한 양의 O₂ 및/또는 CO₂, 적당한 양의 습도, 및 멸균성 또는 거의-멸균성 조건이 제한없이 포함된다. 재세포화 동안, 탈세포화 기관 또는 조직, 및 이에 부착된 재생 세포는 적합한 환경 하에 유지시킨다. 예를 들어, 재생 세포는 영양 보충제 (예: 영양분 및/또는 탄소 공급원, 예컨대 글루코스), 외인성 호르몬 또는 성장 인자, 및/또는 특별한 pH를 요구할 수 있다.

[0042]

재생 세포는 탈세포화 기관 또는 조직에 대해 동종일 수 있거나 (예를 들어, 인간 재생 세포가 시딩된 인간 탈세포화 기관 또는 조직), 또는 재생 세포는 탈세포화 기관 또는 조직에 대해 이종일 수 있다 (예를 들어, 인간 재생 세포가 시딩된 돼지 탈세포화 기관 또는 조직). 본원에 사용된 바와 같은 "동종"은 기관 또는 조직이 유래된 것과 동일한 종 [예를 들어, 자가 (즉, 자기 유래) 또는 관련 또는 비관련 개체]으로부터 수득된 세포를 지칭하는 반면, 본원에 사용된 바와 같은 "이종"은 기관 또는 조직이 유래된 것과 상이한 종으로부터 수득된 세포를 지칭한다.

[0043]

일부 경우에, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 기관 또는 조직은 환자 내로 이식해야 한다. 이들 경우에, 탈세포화 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해 사용된 재생 세포는 상기 환자로부터 수득할 수 있으므로, 재생 세포는 환자에 대해 "자기 유래"이다. 환자로부터의 재생 세포는 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 생의 상이한 단계에서 (예를 들어, 출생 전에, 신생아기에 또는 출산 전후에, 청소년기 동안, 또는 성인으로서), 예를 들어 혈액, 골수, 조직 또는 기관으로부터 수득할 수 있다. 또 다른 한편, 탈세포화 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해 사용된 재생 세포는 환자에 대해 동계일 수 있거나 (즉, 동일한 쌍둥이로부터 유래된다), 재생 세포는, 예를 들어 환자의 친척 또는 환자와 관계가 없는 인간 램프구 항원 (HLA)-매치된 개체로부터의 HLA-매치된 세포일 수 있거나 또는 재생 세포는, 예를 들어 비-HLA-매치된 공여자로부터, 환자에 대해 동종일 수 있다.

[0044]

재생 세포의 공급원에 상관없이 (예를 들어, 자기 유래이든 아니든지 간에), 탈세포화 고형 기관은 환자에 대해 자기 유래, 동종 또는 이종일 수 있다.

[0045]

특정 경우에, 탈세포화 기관은 생체내 세포로 재세포화시킬 수 있다 (예를 들어, 기관 또는 조직을 개체 내로 이식한 후). 생체내 재세포화는, 예를 들어 본원에 기재된 모든 재생 세포를 이용하여 상기 언급된 바와 같이 (예: 주사 및/또는 관류) 수행할 수 있다. 또 다른 한편 또는 부가적으로, 탈세포화 기관 또는 조직에 내인성 세포를 생체내 시딩하는 것은 천연적으로 발생할 수 있거나 또는 재세포화 조직에 전달된 인자에 의해 매개될 수 있다.

[0046]

재생 세포의 진행은 재세포화 동안 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 기관 또는 조직 상의 또는 내의 세포 수는 재세포화 동안 하나 이상의 시점에서 생검을 취함으로써 평가할 수 있다. 또한, 재생 세포가 진행하고 있는 분화의 양은 각종 마커가 세포 또는 세포 집단 내에 존재하는지의 여부를 결정함으로써 모니터링할 수 있다. 이들 세포 유형에 대한 상이한 분화 기와 상이한 세포 유형과 연관된 마커는 당해 분야에 공지되어 있고, 항체 및 표준 면역검정을 이용하여 용이하게 탐지할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Immunology, 2005, Coligan et al, Eds., John Wiley & Sons, Chapters 3 and 11] 참조). 혁산 검정 뿐만 아니라 형태학적 및/또는 조직학적 평가를 사용하여 재세포화를 모니터링할 수 있다. 재세포화 기관의 기능적 분석을 평가할 수도 있다. 예를 들어, 수축 및 심실 압력은 재세포화 심장에서 평가할 수 있고; 일부만 생성, 우레아 생성 및 시토크롬 p450 활성은 재세포화 간에서 평가할 수 있으며; 혈액 또는 매질 여과 및 노 생성은 재세포화 신장에서 평가할 수 있고; 혈액, 글루코스 및 인슐린은 재세포화 췌장에서 평가할 수 있으며; 자극에 대한 반응 및 힘 생성은 재세포화 근육에서 평가할 수 있고; 혈전 형성성은 재세포화 혈관에서 평가할 수 있다.

[0047]

기관 또는 조직을 탈세포화 및/또는 재세포화하기 위한 제어 시스템

[0048]

본 발명은 또한, 기관 또는 조직을 탈세포화 및/또는 재세포화하기 위한 시스템 (예: 생물 반응기)을 제공한다. 이러한 시스템에는 일반적으로, 기관 또는 조직에 캐뉼라 삽입하기 위한 하나 이상의 캐뉼라 삽입 장치; 캐뉼라 (들)를 통하여 기관 또는 조직을 관류시키기 위한 관류 장치; 및 기관 또는 조직에 대한 멸균성 환경을 유지시키기 위한 수단 (예: 봉쇄 시스템)이 포함된다. 캐뉼라 삽입 및 관류는 당해 분야에 널리 공지된 기술이다. 캐뉼라 삽입 장치에는 일반적으로, 기관 또는 조직을 혈관, 관 및/또는 강 내로 도입하기 위한 크기-적당한 공동 튜빙이 포함된다. 전형적으로, 하나 이상의 혈관, 관 및/또는 강을 기관에서 캐뉼라 삽입한다. 관류 장치에는 액체 (예: 세포성 봉괴 매질)용 유지 용기 및 액체를 하나 이상의 캐뉼라를 통하여 기관 내로 움직이기 위한 기전 (예: 펌프, 공기압, 중력)이 포함될 수 있다. 탈세포화 및/또는 재세포화 동안 기관 또는 조직의 멸균성은 당해 분야에 공지된 각종 기술, 예컨대 공기 흐름을 제어 및 여과하고/하거나, 예를 들어 항생제, 항진균제, 또는 원치 않는 미생물의 성장을 방지하기 위한 다른 항미생물제로 관류시키는 기술을 이용하여 유지시킬 수 있다.

[0049]

본원에 기재된 바와 같이 기관 또는 조직을 탈세포화 및 재세포화시키기 위한 시스템은 특정 관류 특징 (예: 압력, 용적, 유동 패턴, 온도, 기체, pH), 기계적 힘 (예: 심실 벽 운동 및 스트레스), 및 전기적 자극 [예: 페이싱 (pacing)]을 모니터링할 수 있는 능력을 보유할 수 있다. 관상 혈관상은 탈세포화 및 재세포화 과정 전반에 걸쳐 변하기 때문에 (예를 들어, 혈관 저항성, 용적), 압력-조절된 관류 장치가 큰 변동을 피하는 데 유리하다. 관류의 유효성은 유출물 및 조직 박편에서 평가할 수 있다. 관류 용적, 유동 패턴, 온도, 부분 O₂ 및 CO₂ 압력, 및 pH는 표준 방법을 이용하여 모니터링할 수 있다.

[0050]

센서를 사용하여 시스템 (예: 생물 반응기) 및/또는 기관 또는 조직을 모니터링할 수 있다. 소노마이크로미터리 (Sonomicrometry), 마이크로마노미터리 (micromanometry) 및/또는 전도도 측정기준을 이용하여 심근벽 운동 및 성능과 비교해서 압력-용적 또는 예비-하중 동원 가능한 스트로크 (stroke) 작업 정보를 획득할 수 있다. 예를 들어, 센서를 사용하여 캐뉼라 삽입된 기관 또는 조직을 통하여 이동하는 액체의 압력; 시스템 내의 주위 온도 및/또는 기관 또는 조직의 온도; 캐뉼라 삽입된 기관 또는 조직을 통하여 이동하는 액체의 유속 및/또는 pH; 및/또는 재세포화되는 기관 또는 조직의 생물학적 활성을 모니터링할 수 있다. 이러한 특징을 모니터링하기 위한 센서를 갖는 것 이외에도, 기관 또는 조직을 탈세포화 및/또는 재세포화하기 위한 시스템에는 또한, 이러한 특징들을 유지 또는 조정하기 위한 수단이 포함될 수 있다. 상기 특징을 유지 또는 조정하기 위한 수단에는 온도계, 온도 조절 장치, 전극, 압력 센서, 과유동 밸브, 액체의 유속을 변화시키기 위한 밸브, 용액의 pH를 변화시키기 위해 사용된 용액에 대한 유체 접촉부를 개방 및 밀폐시키기 위한 밸브, 발룬, 외부 심장 박동 조율기, 및/또는 순응도 챔버와 같은 성분이 포함될 수 있다. 안정한 조건 (예: 온도) 보장을 도와주기 위해, 챔버, 저장고 및 튜빙은 수냉식 (water-jacketed)일 수 있다.

[0051]

재세포화 동안 기계적 하중을 기관 위에 놓아두고 세포를 이에 부착시키는 것이 유리할 수 있다. 한 예로서, 좌심방을 통하여 좌심실 내로 삽입된 발룬을 사용하여 기계적 스트레스를 심장 위에 부하할 수 있다. 용적 및 속도를 조정해 줄 수 있는 피스톤 펌프를 발룬에 연결시켜 좌심실 벽 운동 및 스트레스를 자극할 수 있다. 벽 운동 및 스트레스를 모니터링하기 위해, 마이크로마노미터리, 소노마이크로미터리, 압력-용적 변화, 또는 초음파 심장 검진 (echocardiography)을 이용하여 좌심실 벽 운동 및 압력을 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 외부 심장 박동 조율기를 피스톤 펌프에 연결시켜 심실 발룬 (이는 심장 수축기와 등가이다)의 각 디플레이션을 수반한 동시 자극을 제공할 수 있다. 말초 ECG를 심장 표면으로부터 기록하여 페이싱 전압의 조정, 탈분극 및

재분극의 모니터링을 허용할 수 있고, 재세포화성 또는 재세포화된 심장의 단순화된 표면 지도를 제공할 수 있다.

- [0052] 기계적 심실 확장은 또한, 좌심방을 통하여 좌심실 내로 삽입된 캐뉼라에 연동 펌프를 부착시킴으로써 달성할 수 있다. 발룬을 포함한 상기 언급된 과정과 유사한, 캐뉼라를 통하여 주기적 유체 이동 (예: 박동 혈류)에 의해 달성된 심실 확장이 전기적 자극과 동시에 발생할 수 있다.
- [0053] 본원에 기재된 방법 및 물질을 이용하여, 포유동물 심장을 탈세포화 및 재세포화할 수 있고, 적당한 조건 하에 유지된 경우에는, 수축 기능을 진행하고 폐이성 자극 및/또는 약리학적 작용제에 반응하는 기능적 심장을 생성시킬 수 있다. 이러한 재세포화된 기능적 심장을 포유동물 내로 이식할 수 있고, 이는 일정 주기 동안 기능한다.
- [0054] 도 2는 기관 또는 조직을 탈세포화 및/또는 재세포화하기 위한 시스템의 한 가지 실시양태를 도시한 것이다 (예: 생물 반응기). 도시된 실시양태는 심장을 탈세포화 및 재세포화하기 위한 생물 반응기이다. 이러한 실시양태는 조정 가능한 속도 및 용적 연동 펌프 (A); 심실내 발룬과 연결된 조정 가능한 속도 및 용적 피스톤 펌프 (B); 조정 가능한 전압, 주파수 및 진폭 외부 심장 박동 조율기 (C); ECG 기록기 (D); '동맥 라인' 내의 압력 센서 (관상 동맥 압력과 등가이다) (E); '정맥' 라인 내의 압력 센서 (관상 부비강 압력과 등가이다) (F); 및 심장 박동 조율기와 피스톤 펌프 간의 동기화 (G)를 갖는다.
- [0055] 기관 또는 조직을 생성시키기 위한 시스템은 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체를 프로그램 가능한 프로세서와 조합함으로써 제어할 수 있다 (예를 들어, 본원에 사용된 바와 같은 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체는 프로그램 가능한 프로세서가 특별한 단계를 수행할 수 있도록 하기 위해 그 위에 저장된 지시 사항을 갖는다). 예를 들어, 이러한 저장 매체는 프로그램 가능한 프로세서와 조합하여, 상기 센서들 중의 하나 이상으로부터 정보를 수신하고 처리할 수 있다. 프로그램 가능한 프로세서와 연계한 상기 저장 매체는 또한, 정보와 지시사항을 생물 반응기 및/또는 기관 또는 조직에 다시 전송할 수 있다.
- [0056] 재세포화를 진행하고 있는 기관 또는 조직을 대상으로 하여 생물학적 활성에 관하여 모니터링할 수 있다. 생물학적 활성은 기관 또는 조직 그 자체의 활성, 예컨대 기관 또는 조직의 전기적 활성, 기계적 활성, 기계적 압력, 수축성 및/또는 벽 스트레스일 수 있다. 또한, 기관 또는 조직에 부착된 세포의 생물학적 활성은, 예를 들어 이온 수송/교환 활성, 세포 분할, 및/또는 세포 생육성에 관하여 모니터링할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Laboratory Textbook of Anatomy and Physiology (2001, Wood, Prentice Hall)] 및 [Current Protocols in Cell Biology (2001, Bonifacino et al., Eds, John Wiley & Sons)] 참조). 상기 논의된 바와 같이, 재세포화 동안 기관 상의 활성 하중을 자극하는 것이 유용할 수 있다. 프로그램 가능한 프로세서와 조합한 본 발명의 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체를 사용하여 기관 또는 조직 상의 활성 하중을 모니터링 및 유지하는 데 필요한 성분들을 편성할 수 있다.
- [0057] 한 실시양태에서, 기관 또는 조직의 중량을 본원에 기재된 바와 같은 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체 내로 입력하고, 이러한 저장 매체를 프로그램 가능한 프로세서와 조합하여, 특별한 기관 또는 조직에 대한 관류 압력 및 노출 시간을 계산할 수 있다. 이러한 저장 매체는 전-하중과 후-하중 (각각 관류 전 및 후의 압력), 및 유속을 기록할 수 있다. 이러한 실시양태에서는 예를 들어, 컴퓨터-판독 가능한 저장 매체를 프로그램 가능한 프로세서와 조합하여, 하나 이상의 펌프 및/또는 벨브 제어를 통하여 관류 용액의 유형, 관류 압력 및/또는 관류 방향을 조정할 수 있다.
- [0058] 본 발명에 따라서, 당해 분야의 기술 수준 내에 있는 통상적인 분자 생물학, 미생물학, 생화학, 및 세포 생물학 기술을 이용할 수 있다. 이러한 기술은 당해 분야의 문헌에 상세히 설명되어 있다. 본 발명은 다음 실시예에 추가로 기재될 것이며, 이로써 특허청구범위에 기재된 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.
- [0059] <실시예>
- [0060] 섹션 A. 탈세포화 (파트 I)
- [0061] 실시예 1 - 탈세포화하기 위한 고형 기관의 제조
- [0062] 사후 혈전의 형성을 피하기 위해, 공여자 래트를 400 U의 혜파린/공여자 kg으로 전신 혜파린 처리하였다. 혜파린 처리 후, 심장 및 인접한 대형 혈관을 조심스럽게 제거하였다.
- [0063] 심장을 혜파린 (2,000 U/ml) 함유 생리적 식염수 용액 (0.9%)에 놓아두고, 추가로 처리할 때까지 5°C 하에 유지시켰다. 멸균성 조건 하에, 심장 및 대형 혈관으로부터 연결 조직을 제거하였다. 단섬유의 비-재흡수 가능한

결찰사를 이용하여, 하대 정맥, 및 좌 폐정맥 및 우 폐정맥을 우심방 및 좌심방으로부터 원위 결찰시켰다.

[0064] 실시예 2 - 고형 기관의 캐눌라 삽입 및 관류

관류를 위해 심장을 탈세포화 장치 상에 올려놓았다 (도 1). 하행 흉부 동맥에 캐눌라 삽입하여 역행 관상 관류를 허용하였다 (도 1, 캐눌라 A). 흉부 동맥의 가지 (예: 왼두 동맥, 좌 총 경동맥, 좌 쇄골하 동맥)를 결찰시켰다. 폐동맥을 좌 폐동맥 및 우 폐동맥으로 분할하기 전에 폐동맥에 캐눌라 삽입하였다 (도 1, 캐눌라 B). 상대 정맥에 캐눌라 삽입하였다 (도 1, 캐눌라 C). 이러한 형상은 역행 및 전진 관상 관류 둘 다를 허용해 준다.

[0066] 양성 압력을 대동맥 캐눌라 (A)에 적용한 경우, 모세혈관 상을 통하여 관상 동맥으로부터 우심방에 대한 관상 정맥 시스템 및 상위 대정맥 (C)으로의 관류가 발생하였다. 양성 압력을 상위 대정맥 캐눌라 (C)에 적용한 경우, 모세혈관 상을 통하여 우심방, 관상 부비강 및 관상 정맥으로부터 관상 동맥 및 대동맥 캐눌라 (A)로의 관류가 발생하였다.

[0067] 실시예 3 - 탈세포화

[0068] 심장을 탈세포화 장치 위에 올려 놓은 후, 1 L의 관류물 당 1 내지 5 mmol의 아데노신을 함유하는, 혼파린 처리 시킨 칼슘-무함유 찬 인산염 완충 용액을 이용하여 전진 관류를 시작하여 일정한 관상 유동을 재확립시켰다. 관상 유동은 관상 관류 압력 및 상기 유동을 측정하고, 관상 저항성을 계산함으로써 평가하였다. 안정한 관상 유동 15분 후에, 세정제에 의거한 탈세포화 공정을 개시하였다.

[0069] 본 과정의 상세 내역이 다음에 기재된다. 그러나 간략하게 언급하면, 심장을 세정제로 전진 방향으로 관류시켰다. 관류 후, 심장을 완충제 (예: PBS)로 역행적으로 씻어낼 수 있다. 이어서, 심장을 항생제 함유 PBS로 관류시킨 다음, DNase I을 함유하는 PBS로 관류시켰다. 그 다음, 심장을 1% 벤즈알코늄 클로라이드로 관류시켜 미생물 오염을 감소시키고 추가의 미생물 오염을 방지시킨 다음, PBS로 관류시켜 모든 잔류성 세포성 성분, 효소 또는 세정제의 기관을 세척하였다.

[0070] 실시예 4 - 사체 래트 심장의 탈세포화

[0071] 심장을 8마리 수컷 누드 래트 (250 내지 300 g)로부터 단리시켰다. 해부 직후, 대동맥 아치에 캐눌라 삽입하고, 심장을 표시된 세정제로 역행적으로 관류시켰다. 4가지 상이한 세정제에 의거한 탈세포화 프로토콜 (하기 참조)을 (a) 세포성 성분을 제거하고, (b) 혈관 구조를 보존하는 데에 있어서의 그들의 실행 가능성 및 효능에 관하여 비교하였다.

[0072] 탈세포화는 일반적으로 다음 단계를 포함하였다: 고형 기관의 안정화 단계; 고형 기관의 탈세포화 단계; 고형 기관의 재생 및/또는 중성화 단계; 고형 기관의 세척 단계; 기관 상에 남아있는 모든 DNA를 분해시키는 단계; 기관의 소독 단계; 및 기관의 생체 항상성 단계.

A) 탈세포화 프로토콜 #1 (PEG)

[0074] 심장을, 100 U/ml 폐니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 (Amphotericin) B를 함유하는 200 ml PBS에서 재순환없이 세척하였다. 이어서, 심장을 35 ml 폴리에틸렌글리콜 (PEG; 1 g/ml)로 30분 이하 동안 수동으로 재순환시키면서 탈세포화시켰다. 그 다음, 상기 기관을 재순환용 펌프를 이용하여 24시간 이하 동안 500 ml PBS로 세척하였다. 세척 단계를 매회 마다 24시간 이상 동안 2회 이상 반복하였다. 심장을 수동으로 재순환시키면서 1시간 이상 동안 35 ml DNase I (70 U/ml)에 노출시켰다. 상기 기관을 24시간 이상 동안 500 ml PBS로 다시 세척하였다.

B) 탈세포화 프로토콜 #2 (트리톤 X 및 트립신)

[0076] 심장을, 100 U/ml 폐니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS에서 재순환없이 약 20분 이상 동안 세척하였다. 이어서, 심장을 0.05% 트립신으로 30분 동안 탈세포화시킨 다음, 5% 트리톤-X 및 0.1% 수산화암모늄을 함유하는 500 ml PBS로 약 6시간 동안 관류시켰다. 심장을 탈이온 수로 약 1시간 동안 관류시킨 다음, PBS로 12시간 동안 관류시켰다. 그 다음, 심장을 재순환용 펌프를 이용하여 500 ml PBS에서 매회 24시간 동안 3회 세척하였다. 심장을 1시간 동안 수동으로 재순환시키면서 35 ml DNase I (70 U/ml)으로 관류시키고, 재순환용 펌프를 이용하여 매회 약 24시간 이상 동안 500 ml PBS에서 2회 세척하였다.

C) 탈세포화 프로토콜 #3 (1% SDS)

[0078] 심장을, 100 U/ml 폐니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS에서 재순환없이 약 20분 이상 동안 세척하였다. 심장을 재순환용 펌프를 이용하여 1% SDS를 함유하는 500 ml 물로 약 6시간 이상 동안 탈세포화시켰다. 이어서, 심장을 탈이온수로 약 1시간 동안 세척한 다음, PBS로 약 12시간 동안 세척하였다. 심장을 재순환용 펌프를 이용하여 500 ml PBS로 매회 약 24시간 이상 동안 3회 세척하였다. 그 다음, 심장을 약 1시간 동안 수동으로 재순환시키면서 35 ml DNase I (70 U/ml)으로 관류시키고, 재순환용 펌프를 이용하여 매회 약 24시간 이상 동안 500 ml PBS로 3회 세척하였다.

[0079] D) 탈세포화 프로토콜 #4 (트리톤 X)

[0080] 심장을, 100 U/ml 폐니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS로 재순환없이 약 20분 이상 동안 세척하였다. 이어서, 심장을 재순환용 펌프를 이용하여 6시간 이상 동안 5% 트리톤 X 및 0.1% 수산화암모늄을 함유하는 500 ml 물로 탈세포화시켰다. 이어서, 심장을 탈이온수로 약 1시간 동안 관류시킨 다음, PBS로 약 12시간 동안 관류시켰다. 심장을 재순환용 펌프를 이용하여 매회 24시간 이상 동안 500 ml PBS로 3회 관류시킴으로써 세척하였다. 이어서, 심장을 약 1시간 동안 수동으로 재순환시키면서 35 ml DNase I (70 U/ml)으로 관류시키고, 매회 약 24시간 동안 500 ml PBS에서 3회 세척하였다.

[0081] 초기 실험의 경우에는, 탈세포화 장치를 층류 후드 내에 설정하였다. 심장을 60 cm H₂O의 관상 관류 압력 하에 관류시켰다. 요구되지는 않았지만, 상기 실험에서 언급된 심장을 탈세포화 챔버 내에 올려 놓고, 완전히 잠수시킨 다음, 5 ml/min의 연속 유동 하에 재순환 방식으로 72시간 동안 항생제를 함유하는 PBS로 관류시켜 가능한 많은 세포성 성분과 세정제를 세척 제거하였다.

[0082] 성공적인 탈세포화는 조직학적 박편 내에 근육미세섬유 및 핵이 결여된 것으로서 정의되었다. 혈관 구조의 성공적인 보존은 조직 박편을 봉매시키기 전에 2% 에반스 블루로 관류시킴으로써 평가하였다.

[0083] 고도로 효율적인 탈세포화는 심장을 먼저, 일정한 관상 관류 압력 하에 탈이온 H₂O에 용해된 이온성 세정제 (1% 나트륨-도데실-슬레이트 (SDS), 대략 0.03 M)로 전진 방향으로 관류시킨 다음, 비-이온성 세정제 (1% 트리톤 X-100)으로 전진 방향으로 관류시켜 SDS를 제거하고 추정상 세포외 매트릭스 (ECM) 단백질을 재생시킨 경우에 이 루어졌다. 간헐적으로, 심장을 인산염 완충 용액으로 역행적으로 관류시켜 폐쇄된 모세혈관 및 소형 혈관을 청정하게 하였다.

[0084] 실시예 5 - 탈세포화 기관의 평가

[0085] 탈세포화 후 온전한 혈관 구조를 입증하기 위하여, 탈세포화 심장을 에반스 블루를 이용한 랑겐도르프 관류를 통하여 염색하여 혈관 기저막을 염색시키고, 매크로혈관 및 미세혈관 밀도를 정량화하였다. 추가로, 폴리스티렌 입자를 심장 내로 및 심장을 통하여 관류시켜 관상 용적, 혈관 누출 정도를 정량화하고, 관상 유출물 및 조직 박편을 분석함으로써 관류 분포도를 평가할 수 있다. 3가지 기준의 조합을 평가하고, 단리된 비-탈세포화 심장과 비교하였다: 1) 폴리스티렌 입자의 균등한 분포도, 2) 일부 수준에서 누출도 상의 상당한 변화, 및 3) 미세혈관 밀도.

[0086] 섬유 배향은 단축 또는 쌍축 스트레스를 받은 샘플에 실시간으로 적용할 수 있는 편광 현미경 기술 (문헌 [Tower, et al., 2002, Fiber alignment imaging during mechanical testing of soft tissues, *Ann Biomed Eng.*, 30(10):1221-33] 참조)에 의해 평가하였다. 랑겐도르프 관류 동안 탈세포화 ECM의 기본 기계적 특성을 기록하고 (순응도, 탄성, 집단방출 압력), 신선하게 단리된 심장과 비교하였다.

[0087] 섹션 B. 탈세포화 (파트 II)

[0088] 실시예 1 - 래트 심장의 탈세포화

[0089] 100 mg/kg 케타민 (공급처: Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, MO) 및 10 mg/kg 크실라진 (공급처: Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, MO)을 복강내 주사하여, 12주생 수컷 F344 피셔 (Fischer) 래트 (공급처: Harlan Labs, PO Box 29176 Indianapolis, IN 46229)를 마취시켰다. 좌측 대퇴 정맥을 통하여 전신 혜파린 (공급처: American Pharmaceutical Partners, Inc., Schaumburg, IL) 처리시킨 후, 중앙 흉골절개술을 수행하였고 심장막을 개봉하였다. 흉골 후방 지방체를 제거하고, 상행 흉부 동맥을 해부하고 그의 가지를 결찰시켰다. 대정맥 및 폐정맥, 폐동맥 및 흉부 대동맥을 횡단 절개하고, 심장을 가슴으로부터 꺼냈다. 예비-충전된 1.8 mm 대동맥 캐뉼라 (공급처: Radnoti Glass, Monrovia, CA)를 상행 대동맥 내로 삽입하여 역행 관상 관류를 허용하였다 (랑겐도르프). 심장을 75 cm H₂O의 관상 관류 압력 하에 10 μ M 아데노신을 함유하는 혜파린

처리시킨 PBS (공급처: Hyclone, Logan, UT)로 15분 동안 관류시킨 다음, 탈이온수 중의 1% 나트륨 도데실 술패이트 (SDS) 또는 1% 폴리에틸렌 글리콜 1000 (PEG 1000) (공급처: EMD Biosciences, La Jolla, Germany) 또는 1% 트리톤-X 100 (공급처: Sigma, St. Louis, MO)으로 2 내지 15시간 동안 관류시켰다. 이어서, 탈이온수로 15분 동안 관류시키고, 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (공급처: Sigma, St. Louis, MO)로 30분 동안 관류시켰다. 그 다음, 심장을 항생제 함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (공급처: Gibco, Carlsbad, CA) 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (공급처: Sigma, St. Louis, MO))로 124시간 동안 지속적으로 관류시켰다.

[0090] 1% PEG, 1% 트리톤-X 100 또는 1% SDS로 420분 동안 역행 관류시킨 후, PEG 및 트리톤-X 100 관류는 부종성의 불투명한 외관을 유도시킨 반면, SDS 관류는 거의 반투명한 이식편을 유발시키는 보다 더 현저한 변화를 가져다 주었는데, 이는 불투명 요소가 서서히 세척 제거되었기 때문이다. 3가지 프로토콜 모두에 노출된 심장은 관류 프로토콜 (77.4 mmHg의 일정한 관상 관류 압력 하) 전반에 걸쳐 관상 파열이나 대동맥 판막 기능부전의 명백한 증거 없이 총괄적으로 온전한 상태로 유지되었다. 관상 유동은 처음 관류 60분 동안에 3가지 프로토콜 모두에서 감소되었고, 그 다음 SDS 관류 동안에는 정상화되었으며, 트리톤-X 100 및 PEG 관류에서는 증가된 상태를 유지하였다. SDS 관류는 계산된 관상 저항성에 있어서 가장 높은 초기 증가 ($250 \text{ mmHg.s.ml}^{-1}$ 이하)를 유도하였는데, 그 다음은 트리톤-X ($200 \text{ mmHg.s.ml}^{-1}$ 이하) 및 PEG ($150 \text{ mmHg.s.ml}^{-1}$ 이하)이었다.

[0091] 세정제 관류된 심장 조직의 조직학적 박편을 이용하여, 관찰된 기간 전반에 걸친 탈세포화는 PEG 및 트리톤-X 100 처리된 심장 모두에서 불완전한 것으로 결정되었고; 혈마토크실린-에오신 (H&E) 염색은 핵 및 횡문 필라멘트를 나타내었다. 이와는 달리, SDS-관류된 심장 박편에서는 핵 또는 수축성 필라멘트가 전혀 탐지 가능하지 않았다. 그러나, 혈관 구조 및 ECM 섬유 방향은 SDS-처리된 심장에서 보존되었다.

[0092] 초기 탈세포화 후 ECM으로부터 이온성 SDS를 제거하기 위해, 상기 기관을 트리톤-X 100으로 30분 동안 관류시켰다. 또한, 그리고 모든 세정제의 완전한 세척 제거를 보장하고 생리적 pH를 재확립시키기 위해, 탈세포화 기관을 124시간 동안 탈이온수 및 PBS로 광범위하게 관류시켰다.

실시예 2 - 래트 심장의 탈세포화

[0093] 심장 단리를 위해, 전체 복막 내용물을 젖은 거즈로 싸고 측면으로 조심스럽게 측면으로 이동시켜 복막 후방 공간을 노출시켰다. 장간막 혈관을 결찰시키고 횡단 절개하였다. 복부 대동맥을 결찰시키고, 심장 동맥의 도약 점 아래를 횡단 절개하였다. 흉부 대동맥을 횡경막 바로 위에서 횡단 절개하고, 1.8 mm 대동맥 캐뉼라 (공급처: Radnoti Glass, Monrovia, CA)를 이용하여 캐뉼라 삽입하였다. 심장을 복막 후방으로부터 조심스럽게 꺼내고, 멸균성 PBS (공급처: Hyclone, Logan, UT)에 침수시켜 심장 동맥 상에서의 견인력을 최소화하였다. 15분 동안 혈파린 처리시킨 PBS 관류시킨 다음, 2 내지 16시간 동안 탈이온수 중의 1% SDS (공급처: Invitrogen, Carlsbad, CA)로 관류시키고, 30분 동안 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (공급처: Sigma, St. Louis, MO)로 관류시켰다. 이어서, 간을 항생제 함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (공급처: Gibco, Carlsbad, CA) 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (공급처: Sigma, St. Louis, MO))로 124시간 동안 지속적으로 관류시켰다.

[0094] 420분 동안 SDS 관류시킨 다음, 트리톤-X 100으로 관류시켜, 온전한 혈관계 및 기관 구조를 수반한 완전하게 탈세포화된 심장 ECM 스캐폴드를 산출시켰다. 예반스 블루 관류 결과, 탈세포화 심장 ECM과 유사한 온전한 혈관계가 확인되었다. 탈세포화 심장 피질의 모바트 웜타크롬 (Movat pentachrome) 염색은 어떠한 온전한 세포 또는 핵을 수반하지 않는 근위 및 원위 복잡한 세관 기저막 및 온전한 사구체를 나타내었다. 탈세포화 심장 수질의 염색은 온전한 세관 및 집합관 기저막을 나타내었다. 탈세포화 심장 피질의 SEM은 온전한 사구체 및 세관 기저막을 확인시켜 주었다. 특징적 구조, 예컨대 주변 근위 및 원위 세관 및 사구체 내에서의 사구체성 모세혈관 기저막으로부터 사구체를 묘사한 바우만 (Bowman) 캡슐은 보존되었다. 탈세포화 심장 수질의 SEM 영상은 유두를 향하여 인도되는 온전한 집합관 기저막을 수반한 심장 골반 내로 도달하는 온전한 수질상 피라미드를 나타내었다. 따라서, 심장의 모든 주요 초미세 구조는 탈세포화 후에 온전하였다.

실시예 3 - 래트 폐의 탈세포화

[0095] 폐 (기도 수반)를 가슴으로부터 조심스럽게 꺼내고 멸균성 PBS (공급처: Hyclone, Logan, UT)에 침수시켜 폐동맥 상에서의 견인력을 최소화하였다. 15분 동안 혈파린 처리시킨 PBS 관류시킨 다음, 2 내지 12시간 동안 탈이온수 중의 1% SDS (공급처: Invitrogen, Carlsbad, CA)로 관류시키고, 15분 동안 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (공급처: Sigma, St. Louis, MO)로 관류시켰다. 이어서, 폐를 항생제 함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G

(공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (공급처: Gibco, Carlsbad, CA) 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (공급처: Sigma, St. Louis, MO)로 124시간 동안 지속적으로 관류시켰다.

180분 동안 SDS 관류시킨 다음, 트리톤-X 100으로 관류시켜, 온전한 기도 및 혈관을 수반한 완전하게 탈세포화된 폐 ECM 스캐폴드를 산출시켰다. 조직학적 박편의 모바트 웜타크롬 염색은 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 주요 구조적 단백질 및 또한 프로테오글리칸과 같은 가용성 요소를 포함한 폐에서의 ECM 성분의 존재를 나타내었다. 그러나, 핵 또는 온전한 세포는 전혀 유지되지 않았다. 기도는 주요 기관지로부터 종말 세기관지, 호흡 세기관지, 폐포관 및 폐포까지 보존되었다. 폐동맥 아래로부터 모세혈관 수준 및 폐정맥까지의 혈관상은 온전한 상태로 유지되었다. 탈세포화 폐의 SEM 현미경 사진은 유지된 세포의 명백한 증거는 없지만 보존된 기관지, 폐포 및 혈관 기저막을 나타내었다. 폐포간 충격에 대한 주요 구조적 지지체를 제공하는 탄성 및 망상 섬유의 그물 세공 (meshwork) 뿐만 아니라 충격 기저막은 온전한 상태였는데, 이에는 폐 간질 내에서의 모세혈관의 조밀한 네트워크가 포함된다.

탈세포화 기도의 SEM 현미경 사진은 호흡 상피를 수반하지 않는 거친 루미날 기저막 및 탈세포화 히알린 연골화을 수반하는 온전한 ECM 구조를 나타내었다.

실시예 4 - 래트 간의 탈세포화

간 단리를 위해, 대정맥을 정중 개복술을 통하여 노출시키고, 해부한 다음, 마우스 대동맥 캐뉼라 (공급처: Radnoti Glass, Monrovia, CA)를 이용하여 캐뉼라 삽입하였다. 간 동맥 및 정맥 및 담관을 횡단 절개하고, 간을 복부로부터 조심스럽게 꺼낸 다음, 멸균성 PBS (공급처: Hyclone, Logan, UT)에 침수시켜 간문맥 상에서의 견인력을 최소화하였다. 15분 동안 혜파린 처리시킨 PBS 관류시킨 다음, 2 내지 12시간 동안 탈이온수 중의 1% SDS (공급처: Invitrogen, Carlsbad, CA)로 관류시키고, 15분 동안 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (공급처: Sigma, St. Louis, MO)로 관류시켰다. 이어서, 간을 항생제 함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (공급처: Gibco, Carlsbad, CA) 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (공급처: Sigma, St. Louis, MO))로 124시간 동안 지속적으로 관류시켰다.

120분 동안 SDS 관류시킨 다음, 트리톤-X 100으로 관류시킨 것은 완전하게 탈세포화된 간을 생성시키기에 충분하였다. 탈세포화 간의 모바트 펜타크롬 염색은 간 동맥, 담관 및 간문맥을 함유하는 중앙 정맥 및 문맥 공간을 수반한 특징적 간 구성을 보유하고 있다는 것을 확인시켜 주었다.

실시예 5 - 탈세포화 기관을 평가하기 위해 사용된 방법 및 물질

조직학 및 면역형광. 모바트 펜타크롬 염색은 제조업자 (American Mastertech Scientific, Lodi, CA)의 지시에 따라서 파라핀 봉매된 탈세포화 조직 상에서 수행하였다. 간략하게 언급하면, 탈파라핀 처리된 슬라이드를 베르호이프 (Verhoeff) 탄성 염색물로 염색하고, 세정하며, 2% 염화철에서 분화시키고, 세정하며, 5% 나트륨 티 오술페이트에 놓아두고, 세정하며, 3% 빙초산에서 차단시키고, 1% 알시안 블루 (alcian blue) 용액에서 염색하며, 세정하고, 크로세인 스칼렛 (crocein scarlet) - 산 푸키신 (fuchsin)에서 염색하며, 세정하고, 1% 빙초산에 침지시키며, 5% 포스포텅스트산에서 탈염색하고, 1% 빙초산에 침지시키며, 탈수시키고, 알콜성 사프롱 용액에 놓아두며, 탈수시키고, 올려 놓은 다음 덮었다.

탈세포화 조직 상에서 면역형광 염색을 수행하였다. 항원 구제를 파라핀-봉매된 조직 (탈세포화 조직) 상에서 다음과 같이 수행하였는데, 동결된 박편 (탈세포화 조직) 상에서는 그렇지 않았다: 파라핀 박편을 탈왁스 처리하고, 각각 5분 동안 크실렌을 2회 변화시킴으로서 재수화시킨 다음, 순차적 알콜 구배 및 흐르는 찬 수돗물에서의 세정을 수행하였다. 이어서, 슬라이드를 항원 구제 용액 (2.94 g 삼나트륨 시트레이트, 22 mL의 0.2 M 염산 용액, 978 mL 초순도 물, 및 pH 6.0이 되도록 조정됨)에 놓아두고, 30분 동안 비등시켰다. 흐르는 찬 수돗물 하에 10분 동안 세정한 후, 면역염색을 시작하였다. 동결된 박편을 염색 전에 실온 하에 15분 동안 1 X PBS (공급처: Mediatech, Herndon, VA) 중의 4% 파라포름알데히드 (공급처: Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)로 고정시켰다. 슬라이드를 실온 하에 30분 동안 1 X PBS 중의 4% 태아 소 혈청 (FBS; 공급처: HyClone, Logan, UT)으로 차단시켰다. 샘플을 뚫은 일차 및 이차 항체 (Ab)와 함께 실온 하에 1시간 동안 순차적으로 항온 배양하였다. 각 단계 사이에, 슬라이드를 1 X PBS로 3회 (각각 5 내지 10분) 세척하였다. 콜라겐 I (염소 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-8788), 공급처: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 콜라겐 III (염소 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-2405), 공급처: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 피브로넥틴 (염소 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-6953), 공급처: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 및 라미닌 (Laminin) (토끼 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-20142), 공급처: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)를 각각 1:500의 농도로 항체를 흡착시켰다.

Inc., Santa Cruz, CA)에 대항한 일차 Ab를 차단용 완충제와 함께 1:40 희석도로 사용하였다. 이차 Ab의 소 항-염소 IgG 피코에리틴 (phycoerythrin) (Cat. No. sc-3747, 공급처: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 및 소 항-토끼 IgG 피코에리틴 (Cat. No. sc-3750, 공급처: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)은 차단용 완충제와 함께 1:80 희석도로 사용하였다. 슬라이드를, 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)을 함유하는 경화성 봉입제 (공급처: Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) 중의 커버 유리 (Fisherbrand 22 x 60, Pittsburgh, PA)로 덮었다. 이미지프로 플러스 (ImagePro Plus) 4.5.1 (공급처: Mediacybernetics, Silver Spring, MD)을 이용하여 니콘 에클립스 (Nikon Eclipse) TE200 도립 현미경 (공급처: Fryer Co. Inc., Huntley, IL) 상에서 이미지프로 플러스 (ImagePro Plus) 4.5.1 (공급처: Mediacybernetics, Silver Spring, MD)을 이용하여 영상을 기록하였다.

[0106] 스캐닝 전자 현미경 검사. 정상 및 탈세포화 조직을 15분 동안 0.1 M 카코딜레이트 완충제 (공급처: Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 중의 2.5% 글루타르알데히드 (공급처: Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)로 관류 고정시켰다. 이어서, 조직을 15분 동안 0.1 M 카코딜레이트 완충제로 2회 세정하였다. 1% 사산화オス뮴 (공급처: Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)을 이용하여 60분 동안 후-고정을 수행하였다. 그 다음, 조직 샘플을 증가 농도의 EtOH (10분 동안 50%, 10분 동안 70% 2회, 10분 동안 80%, 10분 동안 95% 2회, 10분 동안 100% 2회)에서 탈수시켰다. 이어서, 조직 샘플은 토우시미스 삼드리 (Tousimis Samdri)-780A (공급처: Tousimis, Rockville, MD) 내에서 임계점 건조를 진행하였다. 덴톤 (Denton) DV-502A 진공 증발기 (공급처: Denton Vacuum, Moorestown, NJ)에서 금/백금 스퍼터 코팅 30초를 이용하여 코팅을 수행하였다. 히타치 (Hitachi) S4700 시야 방출 스캐닝 전자 현미경 (공급처: Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA)을 이용하여 스캐닝 전자 현미경 검사 영상을 찍었다.

[0107] 기계적 시험. 심근 조직의 X 표를 래트의 좌심실로부터 절단하여, 중앙 면적이 대략 5 mm x 5 mm이 되도록 하고, 상기 X 표의 축이 심장의 원주 및 세로 방향으로 정렬되도록 하였다. 상기 조직 X 표의 초기 두께는 마이크로미터 (micrometer)에 의해 측정하였는데, 그 결과 조직 X 표의 중앙에서 3.59 ± 0.14 mm인 것으로 밝혀졌다. X 표를 또한, 탈세포화 래트 좌심실 조직으로부터 동일한 배향 및 동일한 중앙 면적 크기로 절단하였다. 탈세포화 샘플의 초기 두께는 238.5 ± 38.9 μm 였다. 또한, 피브린 젤의 기계적 특성을 시험하였는데, 또 다른 조직 공학 스캐폴드가 혈관 및 심장 조직을 공학 처리하는 데 사용되었다. 피브린 젤을 6.6 mg의 피브린/ml의 최종 농도를 수반한 십자 모양의 주형 내로 주조하였다. 피브린 젤의 평균 두께는 165.2 ± 67.3 μm 였다. 클램프를 통하여 모든 샘플을 쌍축 기계적 시험용 기계 (공급처: Instron Corporation, Norwood, MA)에 부착시키고, PBS에 침수시킨 다음, 양측으로 동등하게 40% 스트레인이 되도록 신장시켰다. 정적 수동 기계적 특성을 정확하게 프로빙하기 위해, 샘플을 4% 스트레인을 증가시키면서 신장시키고, 각 스트레인 값에서 60초 이상 동안 이완시켰다. 힘 값을 특이적 축 방향에서의 단면적 (5 mm x 초기 두께)으로 표준화시킴으로써 힘을 공학 스트레스로 전환시켰다. 공학 스트레스는 초기 길이에 의해 표준화된 전위로서 계산하였다. 두 축 간의 데이터 뿐만 아니라 샘플 군 간의 데이터를 비교하기 위해, 접선 계수를 다음과 같이 계산하였다:

[0108] $[T(\varepsilon = 40\% \text{ 스트레인}) - T(\varepsilon = 36\% \text{ 스트레인})]/4\% \text{ 스트레인}$

[0109] (상기에서, T는 공학 스트레스이고, ε 는 공학 스트레인이다). 접선 계수에 대한 값을 평균 내고, 두 축 간 (원주 및 세로) 뿐만 아니라 군 간을 비교하였다.

[0110] 실시예 6 - 탈세포화 기관의 생체 적합성 평가

[0111] 생체 적합성을 평가하기 위하여, 1 cc의 표준 팽창 배지 [이스코브스 변형 둘백코 배지 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 10% 태아 소 혈청 (공급처: HyClone, Logan, UT), 100 U/ml 폐니실린-G (공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (공급처: Gibco, Carlsbad, CA), 2 mmol/L L-글루타민 (공급처: Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.1 mmol/L 2-머캅토에탄올 (공급처: Gibco, Carlsbad, CA)]에 혼탁된 100,000개 마우스 배아 줄기 세포 (mESC)를 ECM 박판 상으로 및 특이적 성장 인자 자극 또는 공급자 세포 지지체를 수반하지 않은 대조군 판 상으로 시팅하였다. 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 세포 배양 배지에 가하여 세포 핵을 표지시키고 세포 부착 및 팽창을 정량화할 수 있었다. 니콘 이클립스 TE200 도립 현미경 (공급처: Fryer Co. Inc., Huntley, IL) 상에서 이미지프로 플러스 4.5.1 (공급처: Mediacybernetics, Silver Spring, MD)을 이용하여 기준선, 24, 48 및 72시간 후에 위상차 및 UV 광 하에 영상을 기록하였다.

[0112] 탈세포화 ECM은 세포 생육도, 부착 및 종식과 화합성이었다. 시팅된 mESC는 ECM 스캐폴드 상에 접목되었고, 세포 시팅 72시간 내에 매트릭스를 침입하기 시작하였다.

[0113]

실시예 7 - 탈세포화 기관의 평가

[0114]

SDS 탈세포화 래트 심장의 관상 혈관상의 대동맥 판막 적격성 및 완전성은 2% 에반스 블루 염료를 이용한 랑겐 도르프 관류에 의해 평가하였다. 염료로 채워진 좌심실은 전혀 관찰되지 않았는데, 이는 온전한 대동맥 판막을 표시한다. 육안으로는, 네 번째 분지점까지의 관상 동맥이 충전되는 것으로 확인되었는데, 염료 누출 징후는 없었다. 조직 박편에서는, 대형 ($150 \mu\text{m}$) 및 소형 ($20 \mu\text{m}$) 동맥 및 정맥의 관류가 에반스 블루-염색된 혈관 기저막의 레드 형광에 의해 연속해서 확인되었다.

[0115]

주요 심장 ECM 성분의 체류를 확인하기 위하여, SDS 탈세포화 ECM 스캐폴드의 면역형광성 염색을 수행하였다. 이로써, 콜라겐 I 및 III, 페브로넥틴 및 라미닌과 같은 주요 심장 ECM 성분이 존재하는 것으로 확인되었지만, 심장 미오신 중쇄 또는 근절의 알파 악틴을 포함한 수축성 요소 또는 온전한 핵이 유지되었다는 명백한 증거는 나타나지 않았다.

[0116]

SDS 탈세포화 심장 ECM의 스캐닝 전자 현미경 사진 (SEM)은 섬유 배향과 조성이 대동맥 벽 및 대동맥 판막편에 보존되었고, 전체 조직 두께 전반에 걸쳐 세포가 부재한다는 것을 입증해 주었다. 탈세포화된 좌심실 및 우심실 벽은 ECM 섬유 조성 (직물, 지주, 코일) 및 배향을 유지하고 있는 반면, 근섬유는 완전히 제거되었다. 양 심실의 유지된 ECM 내에서는, 내피 또는 평활근 세포를 수반하지 않은 상이한 직경의 온전한 혈관 기저막이 관찰되었다. 더우기, 온전한 심장외막 기저 층 아래의 조밀한 심장외막 섬유 박층이 유지되었다.

[0117]

탈세포화 심장 조직의 기계적 특성을 평가하기 위하여, 쌍축 시험을 수행하고, 이를 심장 조직 공학에서 인공 ECM 스캐폴드로서 빈번히 사용되고 있는 피브린 젤과 비교하였다. 정상 래트 심실과 탈세포화 샘플은 스트레스-스트레인 거동 측면에서 고도로 비등방성이었다. 역으로, 피브린 젤 샘플에서는 스트레스-스트레인 특성이 두 주요 방향 간에 극도로 유사하였다. 스트레스-스트레인 거동의 방향 의존성이 정상 래트 심실 및 탈세포화 군 내의 모든 샘플에 존재하였고, 스트레스-스트레인 특성의 등방성은 피브린 젤 군 내의 모든 샘플에 대표적이었다.

[0118]

이들 두 군 간의 스트레스-스트레인 특성을 비교하고, 또한 심장의 주요 축 간의 스트레스-스트레인 특성을 비교하기 위하여, 원주 방향과 세로 방향 둘 다에서 40% 스트레인 하에 접선 계수를 계산하였다 (방정식에 관해서는 실시예 5 참조). 양 방향에서, 탈세포화 샘플 군은 정상 래트 심실 및 피브린 젤 샘플 군 보다 상당히 더 높은 계수를 갖고 있었다. 그러나, 정상 래트 심실과 탈세포화 매트릭스 둘 다에 대한 두 방향에서의 계수 간에는 상당한 차이가 있었지만, 피브린 젤에 대해서는 그렇지 않았다.

[0119]

온전한 좌심실 조직의 경우에는, 40% 스트레인 하에서의 스트레스가 세로 방향에서는 5 내지 14 kPa로 다양하였고, 원주 방향에서는 15 내지 24 kPa로 다양하였는데, 이는 기준에 공개된 데이터와 일치한다. 래트 심실 조직과 탈세포화 래트 심실 조직 둘 다에서, 원주 방향은 세로 방향 보다 더 견고하였는데, 이는 대개 심장의 근육 섬유 배향때문인 것으로 예상된다. 섬유 배향이 심장 조직의 두께를 통하여 변화되긴 하지만, 대다수의 섬유는 원주 방향으로 배향되므로, 이러한 방향이 더 견고한 것으로 예상될 것이다. 탈세포화 조직은 온전한 조직 보다 상당히 더 견고하였다. 이는 세포외 매트릭스가 세포 그 자체 보다 더 견고하고, ECM과 세포의 조합이 ECM 단독 만큼 견고하지 않을 것으로 예상되기 때문인 것으로 예상되기도 한다. 탈세포화 조직의 접선 계수치가 오히려 큰 것으로 여겨지긴 하지만, 이는 단지 정제된 엘라스틴에 대한 영 (Young) 계수치 (대략 600 kPa) 보다 약간 더 크고, 단일 콜라겐 섬유의 영 계수치 (5 Mpa) 보다 적으므로, 본원에서 결정된 값은 합리적인 범위 내에 두었다.

[0120]

실시예 8 - 다른 기관 또는 조직의 탈세포화

[0121]

래트 심장, 폐, 신장 및 간 이외에도, 본원에 기재된 관류 탈세포화 프로토콜을 골격근, 췌장, 소장 및 대장, 식도, 위, 비장, 뇌, 척수 및 뼈에 적용함으로서 유사한 결과를 생성시켰다.

[0122]

실시예 9 - 돼지 신장의 탈세포화

[0123]

돼지 신장을 헤파린 처리시킨 수컷 동물로부터 단리시켰다. 이와 같이 단리된 기관의 관류를 허용하기 위해, 신장 동맥에 캐뉼라 삽입하고, 혈액을 15분에 걸쳐 PBS 관류로 세척 제거하였다. 탈이온수 중의 27 L의 1% SDS로 관류시키는 것을 50 내지 100 mmHg의 압력 하에 35.5시간 동안 수행하였다. 탈이온수 중의 1% 트리톤-X-100으로 관류시키는 것을 개시하여 ECM 스캐폴드로부터 SDS를 제거하였다. 이어서, 항생제 함유 PBS로 120시간 동안 관류시킴으로써 탈세포화 신장의 세척 및 완충을 수행하여 세정제를 제거하고 생체 적합성 pH를 수득하였다.

[0124]

관류 개시 2시간 내에 기관 클리어링 (clearing)이 관찰되었다. 청정한 백색이 관류 12시간에 우세하였다. 기

관이 반투명한 백색이 되면 탈세포화를 종결하였다.

[0125] 실시예 10 - 탈세포화 심장의 이식

[0126] 원위 대동맥을 Ao 판막에 캐뉼라 삽입하고, 폐 동맥줄기의 좌측 가지 (그의 분기에 대해 원위) 및 하대 정맥 (IVC)를 제외한 다른 모든 대형 혈관 및 폐 혈관을 결찰시킴으로써, F344 래트로부터의 심장을 제조하였다. 탈세포화는 랑겐도르프 역행 관상 관류 및 2 리터의 1% SDS를 이용하여 12 내지 16시간에 걸쳐 달성하였다. 이어서, 심장을 35 ml의 1% 트리톤-X-100으로 30 내지 40분에 걸쳐 재생시킨 다음, 항생제 및 항진균제 함유 PBS로 72시간 동안 세척하였다. 이식 전에 IVC를 결찰시켰다.

[0127] 탈세포화 심장 접수용으로 덩치가 큰 (380 내지 400 그램) RNU 래트를 준비하였다. 숙주 동물의 IVC와 복부 Ao 둘 다에 무딘 각도의 모기 클램프를 적용하여 문합 부위의 단리를 보장하였다. 탈세포화 심장의 대동맥을 8-0 실크 봉합사를 이용하여 심장 가지에 대해 하위 및 근접한 숙주 복부 대동맥에 문합시켰다. 탈세포화 심장의 폐 동맥줄기의 좌측 가지를 숙주 IVC의 가장 근접한 영역에 문합시켜 폐 동맥줄기 상의 물리적 스트레스를 최소화하였다.

[0128] 양 혈관을 숙주 동물 내로 페맨 다음, 클램프를 풀어주고 탈세포화 심장을 숙주 동물의 혈액으로 채웠다. 수용자 동물의 복부 대동맥 압력을 탈세포화 심장 및 대동맥에서 가시적으로 관찰하였다. 탈세포화 심장은 팽창되었고 혈액으로 인해 적색이 되었다. 문합 부위에서의 출혈은 최소 수준이었다. 클램프를 풀어준지 3분 후 (관류의 개시) 헤파린을 투여하고, 심장 사진을 찍은 다음, 복부 내에 위치시켜 문합 부위에서의 스트레스를 최소화하였다. 복부를 멸균 방식으로 닫고, 회복 여부를 알아보기 위하여 동물을 모니터링하였다. 이식 후 55시간에, 동물을 안락사시키고, 관찰을 위해 탈세포화 심장을 체외 이식하였다. 헤파린을 투여하지 않은 동물은 해부 및 평가시 LV에서 큰 혈전증을 나타내었다. 심장의 우측과 좌측 모두에서 관상 동맥 내에 혈액이 관찰되었다.

[0129] 다른 이식체 실험에서는, 양 혈관을 숙주 동물 내로 페맨 후에 클램프를 풀고, 탈세포화 심장을 숙주 동물의 혈액으로 채웠다. 수용자 동물의 복부 대동맥 압력을 탈세포화 심장 및 대동맥에서 가시적으로 관찰하였다. 탈세포화 심장은 팽창되었고 적색이 되었으며, 문합 부위에서의 출혈은 최소 수준이었다. 클램프를 풀어준지 3분 후 (관류의 개시) 헤파린을 IP 주사에 의해 투여하였다 (3,000 IU). 심장 사진을 찍은 다음, 복부 내에 위치시켜 문합 부위에서의 스트레스를 최소화하였다. 복부를 멸균 방식으로 닫고, 회복 여부를 알아보기 위하여 동물을 모니터링하였다. 동물은 이식 후 대략 48시간에 출혈로 인해 사망한 것으로 밝혀졌다. 이식 시간은 현재 55 내지 70분 범위이다.

[0130] 섹션 C. 재세포화

[0131] 실시예 1 - 심장 ECM 슬라이스의 재세포화

[0132] 탈세포화 ECM의 생체 적합성을 평가하기 위하여, 하나의 탈세포화 심장의 1 mm 두께 슬라이스를 균원성 및 내피 세포주와 함께 배양하였다. 2×10^5 개 래트 골격 근육모세포, C2C12 마우스 근육모세포, 인간 제대 내피 세포 (HUVEC), 및 소의 폐 내피 세포 (BPEC)를 조직 박편 내로 시팅하고, 표준 조건 하에 7일 동안 공동-배양하였다. 균원성 세포는 ECM을 통하여 이동하였고, ECM 내에서 팽창하였으며, 본래의 섬유 배향으로 정렬하였다. 이들 균원성 세포는 증가된 증식을 나타내었고, ECM 슬라이스의 큰 부분이 완전히 재-이주하였다. 내피 세포주는 덜 침입성인 성장 패턴을 보여주어, 이식편 표면 상에 단층을 형성하였다. 이들 조건 하에서는 탐지 가능한 항증식 효과가 전혀 없었다.

[0133] 실시예 2 - 관상 관류에 의한 심장 ECM의 재세포화

[0134] 관상 관류에 의한 탈세포화 심장 ECM 상으로 및 내로의 재생 세포 시팅 효율을 결정하기 위하여, 탈세포화 심장을 기관 챔버 내로 옮기고, 세포 배양 조건 (5% CO₂, 60% 습도, 37°C) 하에 산소화 세포 배양 배지로 지속적으로 관류시켰다. 120×10^6 개 PKH 표지된 HUVEC (50 ml의 내피 세포 성장 배지에 혼탁됨)를 40 cm H₂O 관상 관류 압력 하에 주입하였다. 관상 유출물을 모으고, 세포를 계수하였다. 이어서, 유출물을 재순환시키고 다시 관류시켜 최대 수의 세포를 전달하였다. 재순환을 2회 반복하였다. 세 번째 계대집종 후, 대략 90×10^6 개 세포가 심장 내에 유지되었다. 심장을 120시간 동안 500 ml의 재순환성 산소화 내피 세포 배양 배지로 지속적으로 관류시켰다. 이어서, 심장을 꺼내고, 한랭 박편화를 위해 봉매시켰다. HUVEC를 심장 전반에 걸쳐 동맥성 및 정맥성 잔류물에만 국한시켰지만, 혈관외 ECM 전반에 걸쳐 완전히 분산되지는 못하였다.

- [0135] 실시예 3 - 신생아 래트 심장 세포를 이용한 탈세포화 래트 심장의 재세포화
- [0136] 래트 신생아 심장세포의 단리 및 제조. 1일날, 1 내지 3일생의 8 내지 10마리의 SPF 피셔-344 신생아 새끼 (공급처: Harlan Labs, Indianapolis, IN)에게 5% 흡입용 이소플루란 (공급처: Abbott Laboratories, North Chicago, IL)을 투여하여 진정시키고, 70% EtOH을 분무시키며, 신속한 흉골절개술을 멀균 방식으로 수행하였다. 심장을 절개하고, HBSS [신생아 심근세포 단리 시스템으로부터의 시약 #1 (공급처: Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)]를 함유하는 열음 상에서 50 ml 원뿔형 튜브 내에 즉시 놓아두었다. 상등액을 제거하고, 전체 심장을 격렬하게 와동시킴으로써 찬 HBSS로 1회 세척하였다. 심장을 5 ml 찬 HBSS를 함유하는 100 mm 배양 디쉬에 옮기고, 연결 조직을 제거하며, 나머지 조직을 잘게 썰어 1 mm³ 미만의 조각이 되도록 하였다. 부가의 HBSS를 가하여 총 판 용적이 9 ml가 되도록 하였고, 이에 1 ml 트립신 [시약 #2, 월팅تون (Worthington) 키트]을 가하여 50 µg/ml의 최종 농도를 수득하였다. 판을 5°C 냉각기에서 밤새 항온 배양하였다.
- [0137] 2일날, 판을 냉각기로부터 꺼내고 열음 상의 멀균 후드에 놓아두었다. 조직 및 트립신-함유 완충제를, 주등이 가 큰 피펫을 이용하여 열음 상의 50 ml 원뿔형 튜브에 옮겼다. 트립신 억제제 (시약 #3)를 1 ml HBSS (시약 #1)로 재구성하였고, 이를 50 ml 원뿔형 튜브에 가한 다음, 온화하게 혼합하였다. 액체 표면 상으로 공기를 통과시킴으로써 상기 조직을 60 내지 90초 동안 산소화하였다. 이어서, 조직을 37°C로 가온시키고, 5 ml 라이보비츠 (Leibovitz) L-15로 재구성된 콜라케나제 (300 단위/ml)를 서서히 가하였다. 조직을 45분 동안 가온 (37°C) 진탕기 속 내에 놓아두었다. 그 다음, 10 ml 피펫을 이용하여 조직을 10회 적정시켜 세포를 방출시킨 다음 (초당 3 ml), 0.22 µm 필터를 통하여 염색하였다. 조직을 부가의 5 ml의 L-15 배지로 세척하고, 2회 적정시킨 다음, 동일한 50 ml 원뿔형 튜브에 모았다. 이어서, 세포 용액을 실온 하에 20분 동안 항온 배양하고, 5분 동안 50 xg로 방사하여 세포를 펠릿화하였다. 상등액을 온화하게 제거하고, 신생아-심근세포 배지를 이용하여 세포를 목적하는 용적으로 재현탁시켰다.
- [0138] 배지 및 용액. 모든 배지를 멀균성 여과시키고, 5°C 냉각기 중의 암실에서 저장하였다. 월팅تون 단리 키트는 배양을 위해 제안된 배지인 라이보비츠 L-15를 함유한다. 이 배지는 조직 처리 2일째에만 사용하였다. 도말하기 위하여, 대체 칼슘-함유 배지를 사용하였는데, 이는 본원에 기재되어 있다. 월팅تون 라이보비츠 L-15 배지: 라이보비츠 배지 분말은 1 L의 세포-배양 등급 수를 이용하여 재구성하였다. 라이보비츠 L-15 배지는 140 mg/ml CaCl, 93.68 mg/ml MgCl, 및 97.67 mg/ml MgS을 함유한다. 신생아-심근세포 배지: 이스코브스 변형 둘백코 배지 (공급처: Gibco; Cat. No. 12440-053)를 10% 태아 소 혈청 (공급처: HyClone), 100 U/ml 페니실린-G (공급처: Gibco), 100 U/ml 스트렙토마이신 (공급처: Gibco), 2 mmol/L L-글루타민 (공급처: Invitrogen), 및 0.1 mmol/L 2-머캅토에탄올 (공급처: Gibco; Cat. No. 21985-023)으로 보충시키고, 사용 전에 멀균성 여과시켰다. 암포테리신-B를 필요한 만큼 가하였다 (0.25 µg/ml 최종 농도). 이 배지에 1.2 mM CaCl (공급처: Fisher Scientific; Cat. No. C614-500) 및 0.8 mM MgCl (공급처: Sigma; Cat. No. M-0250)를 증강시켰다.
- [0139] 재세포화의 시험관내 배양 분석. 생물학적 인공 심장을 창출하는 것에 관한 단계로서, 단리된 ECM을 신생아 심장-유래 세포로 재세포화시켰다. 완전히 탈세포화된 심장 (본원에 기재된 바와 같이 만듬)에 50×10^6 개의 신선하게 단리된 래트 신생아 심근세포, 섬유세포, 내피 세포 및 평활근 세포의 조합물을 주사하였다. 이어서, 심장 조직을 슬라이스 조각내고, 이 슬라이스를 시험관 내에서 배양하여 탈세포화 ECM의 생체 적합성 및 이로써 생성된 구조물이 심근 환으로 발달할 수 있는 능력을 시험하였다.
- [0140] 생성된 환 내에서의 최소 수축이 24시간 후에 현미경 검사에 의해 관찰되었는데, 이는 이식된 세포가 탈세포화 ECM에 부착되어 접목될 수 있었다는 것을 입증해준다. 현미경 검사에 의하면, 세포는 ECM 섬유 방향을 따라 배향되었다. 면역형광 염색 결과, 심장 미오신 중쇄를 발현하는 심근 세포의 생존 및 접목이 확인되었다. 4일 이내에, 수축성 세포 패치의 접락이 탈세포화 매트릭스 상에서 관찰되었는데, 이는 8일까지 동시에 수축성 조직 환으로 진행되었다.
- [0141] 10일날, 이들 환을 2개의 막대 사이에 놓아두어 상이한 예비-하중 조건 하에서의 수축력을 측정하였다. 상기 환은 4 Hz의 주파수까지 전기적 페이스를 유지할 수 있었고, 0.65 g 이하의 예비-하중 하에 3 mN 이하의 수축력을 창출시킬 수 있었다. 따라서, 이러한 재세포화의 시험관내 조직 배양 접근 방식을 이용하여, 인공 ECM 구조물을 사용하여 최적으로 공학 처리시킨 심장 조직 환에 의해 생성된 바와 동등하게 유효한 힘을 생성시키는 수축성 조직을 수득하였다.
- [0142] 관류를 통한 탈세포화 심장의 재세포화. 재세포화된 (50×10^6 개의 신선하게 단리된 래트 신생아 심근세포, 섬

유세포, 내피 세포 및 평활근 세포) 스캐폴드를, 멸균성 심장 조직 배양 조건 (5% CO₂, 60% H₂O, 37°C) 하에 예비-하중 및 후-하중 (1일: 예비-하중 4 내지 12 mmHg, 후-하중 3 내지 7 mmHg), 박동 판상 혈류 (1일: 7 ml/min), 및 전기적 자극 (2일: 1 Hz)을 점차적으로 증가시키면서 박동성 좌심실 확장을 포함한 래트 심근 생리 상태를 자극한 관류 가능한 생물 반응기 (n=10)에 올려 놓았다. 관류된 기관 배양물을 1 내지 4주 동안 유지시켰다. 전체 배양 기간 내내 압력, 혈류 및 EKG를 15분마다 30초 동안 기록하였다. 신생 생물학적 인공 심장의 비디오를 세포 시딩 후 4일, 6일 및 10일째에 기록하였다.

[0143] 세포 시딩 후 10일째에, 좌심실 압력 (LVP)을 기록하기 위한 좌심실 내로의 압력 프로브의 삽입 및 벽 운동의 비디오 기록 (자극 주파수가 0.1 Hz에서 10 Hz으로 점차적으로 증가하였기 때문이다)을 포함한 보다 상세한 기능적 평가를 수행하였고, 페닐에프린 (PE)으로의 약리학적 자극을 수행하였다. 재세포화된 심장은 LVP 상의 상응하는 증가와 함께 페이스를 유지시킨 수축 후 자발적 수축과의 단일 페이스에 대한 수축성 반응을 나타내었다. 단일 페이스 후, 심장은 3가지 자발적 수축을 나타낸 다음, 세동성 상태로 전환되었다. 자극된 수축과 유사하게, 자발적 탈분극은 LVP 및 기록 가능한 QRS 복합체 상의 상응하는 증가를 유발시켰는데, 이는 아마도 발달하는 안정한 전도 패턴의 형성을 표시한다.

[0144] 일단 자극 주파수가 0.4 Hz로 증가하게 되면, 평균 2개의 자발적 수축이 각 수축 유도 후에 발생하였고; 1 Hz 이하의 페이싱 주파수에서는, 단지 1개의 자발적 수축 만이 발생하였으며, 5 Hz의 페이싱 주파수에서는, 자발적 수축이 전혀 발생하지 않았다. 최대 포획 속도는 5 Hz였는데, 이는 성숙한 심근에 대한 250 ms의 불응기와 일치한다. 100 μM의 PE로 관류시킨 후, 규칙적인 자발적 탈분극이 1.7 Hz의 주파수에서 발생하였고, 이를 LVP 상의 상응하는 증가와 연계시켰다.

[0145] 10일째 조직학적 분석 결과, 좌심실 벽 전층 (0.5 내지 1.2 mm)에 걸쳐 세포 분산과 접목이 나타난 것으로 밝혀졌다. 심실 섬유 방향으로 정렬되고 조밀한 부위를 형성한 심근 세포는 성숙한 심근과 유사한 이식편 및 발생기 심근과 유사한 덜 조밀한 미성숙 이식편으로 조직되었다. 심장 미오신 중쇄에 대한 면역형광 염색은 심근 세포 표현형을 확인시켜 주었다. 모세혈관 간의 평균 직경이 대략 20 μm인 새로이 발생된 심근 전반에 걸쳐 고도의 모세혈관 밀도가 유지되었는데, 이는 성숙한 래트 심근에 대해 보고된 바와 유사하다. 내피 세포 표현형이 폰 빌레브란트 인자 [von Willebrand Factor (vWF)]에 대한 면역형광성 염색에 의해 확인되었다. 이식편 전층에 걸쳐 세포 생육도가 유지되었는데, 이는 관상 관류를 통한 충분한 산소 및 영양분 공급을 나타낸다.

섹션 D. 부가의 탈세포화 및 재세포화

실시예 1 - 래트 간 단리 과정

[0148] 각 래트를 체중 1 kg당 75 mg의 케타민 및 체중 1 kg당 10 mg의 크실라진으로 마취시켰다. 래트의 복부를 면도하고 베타딘으로 멸균시켰다. 래트의 위내 정맥 내로 다량의 나트륨 혜파린 [100 μl 혜파린 (1,000 UI/ml 스톡)/체중 100 g]을 정맥내 투여하였다.

[0149] 혜파린이 효력을 발휘하기 시작하는 동안, 생물 반응기 플라스크를 어셈블리하였다. 간략하게 언급하면, 타이곤 (tygon) 투빙을 250 ml 플라스크 (기재 측면 상에 포트됨)에 부착시키고, 리듀서 투빙 어댑터 (reducer tubing adaptor)를 상기투빙에 부착시켰다 (다음에 기재되는 세척 단계 동안 배수구로서 작용하기 위함). 혜파린이 효력을 발휘하기 시작하는 동안, 고무 스토퍼를 수반한 카테터를 어셈블리하고; 12 cc 주사기에 PBS를 채워 넣고 3-방식 정지 코크를 주사기에 부착시켰다. 18 게이지 바늘을 상기 주사기에 부착시키고, 8호 고무 스토퍼를 통하여 밀어붙였다. 간이 혈관 내에 편평하게 놓여있게 하기 위해서는, 상기 바늘이 스토퍼의 바닥과 편평하게 유지되는 것이 바람직하다. 용융된 플랜지를 수반한 폴리에틸렌 투빙 (예: PE 160)의 짧은 조각을 알콜 멸균시킨 후, 이를 투빙의 자유 말단 상으로 미끄러지게 하였다. 소량의 PBS를 카테터 내로 밀어넣어 알콜이 흘러 넘치게 하였고, 단리된 간을 덮기에 충분한 PBS를 10 cm 페트리 디ッシュ (petri dish)에 채워 넣었다.

[0150] 혜파린을 순환시킨 후, 복부 피부를 절단하고, 하층 복부 근육을 노출시켰다. 중앙-개복술을 수행한 다음, 복부벽을 따라 측부 횡단 절개 또는 중앙선 절개를 수행한 후, 뒤당김을 수행하여 간을 노출시켰다. 은화하게 (글리송 캡슐은 부서지기 쉽다), 간을 십이지장, 위, 횡경막 및 전방 복부벽에 부착시켜 주는 인대를 절단 제거하였다. 총 담관, 간동맥, 및 간문맥을 절단하여, 카테터를 삽입하기에 충분한 길이가 되도록 하고, 최종적으로는 초미세 간 하대 정맥을 절단하였다. 부착된 나머지 초미세 간 하대 정맥을 유지시키고, 간을 PBS 함유 페트리 디ッシュ 내에 놓아둠으로써 간을 제거하였다. 나머지 모든 인대를 절단 제거하였다.

실시예 2 - 간의 탈세포화

- [0152] 상기와 같이 제조된 카테터를 간문맥 내로 삽입하고, 프롤린 봉합선으로 묶었다. 라인의 완전성을 검증하였고, 주사기 내의 PBS (Mg^{+2} 및 Ca^{+2} 를 수반하지 않음)를 이용하여 관류시킴으로써 간으로부터 잠혈을 제거하였다. 간-고무 스토퍼를 생물 반응기 내에 놓아두었다. 플라스크를 집합 저장고 상에 놓아두고, 1% SDS (1.6 L)의 용기를 충분한 길이의 라인을 통하여 부착시켜 대략 20 mmHg의 최대 압력을 생성시키는 칼럼을 제조하였다. 관류 2 내지 4시간 후, 1% SDS의 용기를 비우고, 1% SDS 1.6 L를 더 채워 넣었다. 1.6 L의 1% SDS 총 4개 배치를 전형적으로 사용하여 간을 관류시켰다. 탈세포화 후, 간은 외관상 청정한 백색이 되었고, 혈관 도관이 가시적이었다.
- [0153] 2일째에, SDS 저장고의 연결을 끊고, dH_2O 로 충전된 60 ml 주사기로 대체시켰다. 수 세정에 이어 60 ml의 1% 트리톤 X-100으로 세정한 후, 60 ml dH_2O 를 이용하여 또 다른 세척을 수행하였다. 이와 같이 세정된 간은 세척을 위해 설정되었고, 소형 펌프 (50% 최대 용량의 마스터플렉스; 약 1.5 ml/min)를 이용하여 항미생물제 [예: 페니실린 - 스트렙토마이신 (예: Pen-Strep[?])]를 수반한 PBS로 관류를 시작하였다. 일정 길이의 타이gon 튜빙은 생물 반응기/플라스크 배수구로부터 PBS 저장고로 진행하였다. 일정 길이의 튜빙은 펌프를 통하여 플라스크 상의 3 방식 스톱코크에 부착된 0.8 마이크론 필터로 진행되었다. 18 게이지 바늘을 PBS 저장고 내의 튜빙에 부착시켜 이를 유입선 보다 더 낮게 유지시켰다. 6시간 후, 세척물을 1 X 농도 하에 Pen-Strep를 수반한 신선한 PBS로 대체시키고, 0.8 마이크론 필터를 변화시킨 다음, 해당 기관을 밤새 세척하였다.
- [0154] 3일째에는, 1 X 농도 하에 Pen-Strep를 수반한 PBS 500 ml를 2회 이상 변화시킴으로써 세척을 지속하였다. 각 PBS 변화시, 0.8 마이크론 필터도 변화시켰다. 아침에 세 번째 세척을 시작하였고, 6시간 후에 변화시켰으며, 최종 세척을 다시 수행하여 밤새 진행되도록 하였다. 4일째, 간은 재세포화에 사용될 준비가 되었다.
- [0155] 1.6 L의 1% SDS로 2회 세척한 간은 평균 14.27%의 DNA가 잔존하는 반면, 1.6 L의 1% SDS로 4회 세척한 간은 평균 5.36%의 DNA가 잔존하였다. 즉, 1% SDS로 2회 세척하면 (사체와 비교해서) DNA의 대략 86%가 제거된 반면, 1% SDS로 4회 세척하면 (사체와 비교해서) 대략 95%의 DNA가 제거되었다.
- [0156] 도 3a는 래트 간 뿐만 아니라 래트 신장의 탈세포화를 도시한 것이고, 도 3b는 래트 심장 및 래트 폐의 탈세포화를 도시한 것이다. 중간 부분은 진행성 탈세포화의 사진을 함유하고 있고, 우측 및 좌측 사진은 탈세포화 기관의 SEM 영상이다. 도 4는 탈세포화 돼지 신장 및 염료로 관류시킨 래트 신장을 도시한 것이고, 또한 탈세포화 신장의 세관 및 사구체의 EM 사진을 도시한 것이다. 도 5는 본원에 기재된 바와 같이 탈세포화시킨 전체 래트 사체를 도시한 것이다.
- [0157] 실시예 3 - 간의 재세포화
- [0158] 세포 (4천만 개의 일차 간-유래 세포 또는 HepG2 인간 세포)를 1 밀리리터당 약 8백만 개 세포 (전형적으로 5 ml 중)로 가온 배지 ($37^{\circ}C$)에 혼탁시키고, 이를 주사기 내로 부하함으로써 재세포화를 수행하였다. 상기 세포를 간문맥을 통하여 주입하는 동안, 간은 생물 반응기 또는 페트리 디ッシュ 내에 있었다. 세포를 또한 또는 또 다른 한편으론, 다른 모든 혈관 접근을 통하여 주입하거나 또는 실질 내로 직접 주사할 수 있다는 것을 인지해야 한다.
- [0159] 일차 간-유래 세포는 월팅톤 효소 분해 키트를 이용하여 성인 래트 간을 효소적으로 분해함으로써 수득하였다. 간략하게 언급하면, 래트 간을 간문맥을 통하여 20 ml/min으로 10분 동안 1 X 칼슘- 및 마그네슘-무함유 한크스 밸런스 염 용액 (키트 바이알 #1)으로 관류시킨 후에 래트로부터 제거하였다. 이어서, 키트 바이알 #2 및 #3으로부터의 효소 [콜라게나제 (22,500 단위), 엘라스타제 (30 단위) 및 DNase I (1,000 단위)]를 함유하는 MOPS 완충제를 수반한 100 ml의 L-15을 이용하여 20 ml/min으로 10 내지 15분 동안 간을 재순환시켰다. 이어서, 상기 기관을 기계적으로 봉괴시켜 세포를 방출시켰다. 세포를 100 g으로 원심분리시키고, 배양 배지에 2회 재현탁시킨 후에 재세포화용으로 사용하였다.
- [0160] 상기 공정 동안 관찰된 가시적 신호 (예를 들어, 관류된 간 엽의 장력, 간으로부터의 세포의 탈출, 및 표적 간 엽을 통한 세포의 분포도)를 기준으로 하여 관류 속도를 제어하였다. 재세포화 후, 생물 반응기 내부에 있는 간을 $37^{\circ}C$ 및 5% CO_2 하의 항온 배양기 내로 놓아두었다. 산소화 배지 저장고를 부착시켰고 (50 ml의 배지 함유); 흡습 카르보젠 (carbogen) (95% 산소, 5% 이산화탄소)을 저장고 내의 배지를 통하여 베블링시켰다. 연동 펌프를 사용하여 상기 배지 ($37^{\circ}C$ 하)를 2 내지 10 ml/min 범위의 속도로 간을 통하여 재순환시켰다. 재세포화된 래트 간을 7일 동안 매일 배지 변화시키면서 유지시켰다 (하지만, 본 실험은 편의상 7일째에 간단히 종결시켰다). 배지를 샘플링하고, 매일 변화시키는 동안 $-20^{\circ}C$ 하에 저장하여 일부만 및 우레아를 측정하였다. 7일

째에, 시토크롬 P-450 검정을 수행하였다.

[0161] 도 6은 탈세포화 래트 간의 재세포화를 도시한 것이다. 주사기를 이용하여 일차 간세포를 간문맥 카테터를 통하여 단일 엽 내로 주사하였다. 도 7은 탈세포화 래트 간의 꼬리엽 (a) 또는 탈세포화 래트 간의 하위/상위 우측 외측엽 (b) 내로의 일차 래트 간세포의 표적화 전달을 도시한 것이다.

[0162] 도 8은 1주 동안 배양된 재세포화 래트 간의 스캐닝 전자 현미경 검사 (SEM)를 나타낸다. 이들 데이터는 초미세구조 수준에서 사체 간과 재세포화 간의 유사성을 보여준다. 세포를 매트릭스 상 내로 통합시켰고, 신선하게 단리된 사체 조직에서와 유사한 외형을 갖고 있었다. 도 9는 매송 삼색 염색 (a) 및 H&E 염색 (b)을 도시한 것이고, 도 10a는 TUNEL 분석을 도시한 것이며, 도 10b는 래트 간세포를 꼬리 돌기 내로 주사한지 1주 후 재세포화 래트 간의 매송 삼색 염색을 도시한 것이다. 이들 결과는 간 세포가 매트릭스 내로 전달될 수 있고, 이러한 매트릭스 내에 유지되며, 영양분의 관류에 가시적일 수 있다는 것을 입증해준다.

[0163] 도 11은 인간 간 세포주 (HepG2)를 꼬리 돌기 (a) 또는 상위/하위 우측 외측엽 (b) 내로 주사한 지 1주 후 재세포화 래트 간의 매송 삼색 염색을 도시한 것이다. 도 12는 일차 래트 간세포 (1-6) 및 인간 HepG2 세포주 (7 및 8)의 세포 체류를 보여주는 그래프이다. 세포는 간 내로 관류된 세포의 총 수에 대하여 주사 전에 계수하였고, 매트릭스를 통하여 유동하였고 페트리 디쉬 내에서 종결된 비-부착성 세포를 계수하였는데; 그 차이가 매트릭스 내에 유지된 세포를 나타낸다. 도 13은 인간 HepG2 세포가 여전히 가시적이고 탈세포화 래트 간 내로의 주사 후에도 증식한다는 것을 보여주는 그래프이다.

실시예 4 - 간 기능

[0165] 탈세포화 및 재세포화 간의 기능을 다음과 같이 평가하였다. 우레아 생성 (도 14), 알부민 생성 (도 15), 및 시토크롬 P-450 IAI [에톡시레소루핀-0-데에틸라제 (EROD)] 활성 (도 16)은 일차 래트 간세포로 재세포화된 간에서 평가하였다. 우레아 생성은 베르텔로트 (Berthelot)/비색 검정용 키트 (공급처: Pointe Scientific Inc.)를 이용하여 결정한 반면, 알부민 생성 및 EROD 활성은 문헌 [Culture of Cells for Tissue Engineering, Vunjak-Novakovic & Freshney, eds., 2006, Wiley-Liss]으로부터 변형된 방법을 이용하여 검정하였다. 이들 실험 결과, 간 유래된 세포가 배양 기간 동안 간-특이적 기능성을 유지하고 있다는 것이 입증되었다.

실시예 5 - 재세포화 후 세포 생육도

[0167] 도 17은 배아 및 성인 유래 줄기/기원 세포가 탈세포화 심장, 폐, 간 및 신장 상에서 3주 이상 동안 증식하였다는 것을 보여주는 그래프이다. 세포의 증식은 고 배율 시야당 DAPI-염색된 핵의 수를 계수함으로써 결정하였다. 도 18은 마우스 배아 줄기 세포 (mESC) 및 증식성 성인 근육 기원 세포 (골격 근육모세포; SKMB)가 탈세포화 심장, 폐, 간 및 신장 상에서 살아 있었다는 것을 보여주는 그래프이다. 세포의 생육도는 3주 후 DAPI 염색된 세포 핵의 총 수와 비교한 세포소멸 정도를 탐지하기 위한 턴넬 검정을 이용하여 결정하였다.

[0168] 인간 배아 줄기 (ES) 세포 및 인간 유도된 다능성 줄기 (iPS) 세포는 탈세포화 심장 매트릭스 상에서 1주 이상 동안 증식하였다. 간략하게 언급하면, 인간 ES 세포 [와이셀 리서치 인스티튜트 (WiCell Research Institut e)로부터의 H9; 내셔널 스템 셀��크 (NSCB)로부터의 WA09] 및 인간 iPS 세포의 IMR90 서브클론 (문헌 [Zhang et al., 2009, *Circ. Res.*, 104:e30-e41]에 기재된 바와 같고, 위스콘신 대학의 닉터 티모시 캠프 (Dr. Timoth Kamp)로부터 수득된 *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, 및 *LIN28* 렌티바이러스성 트랜스-유전자를 이용하여 생성됨)을 탈세포화 매트릭스 상에서 비교하였다. 증식성 섬유아세포 및 다른 비-고동 (non-beating) 세포 중에서 20 내지 50% 심장세포를 함유한 H9 세포 및 iPS 세포를 각각 200,000개 세포 및 90,000개 세포 밀도로, 매트릭스의 내부를 노출시키기 위해 단리시킨 래트 탈세포화 심장 매트릭스의 챔버-특이적 (우 또는 좌 심방 또는 심실) 조각을 함유한 웰 내로 도말하였다. 세포를 탈세포화 매트릭스 상으로 간단히 침착시켰다. 세포를 3일 동안 20% 혈청을 함유하는 배지에서 성장시킨 후, 그 다음 4일 동안은 혈청을 2% 가 되도록 감소시켰는데, 이는 증식성 근육 세포가 시험관 내에서 고동 근세포 표현형으로 "이동"하는 것과 일치한다. 대조군 세포를 젤라틴 (0.1%)으로 코팅한 동일한 웰 내로 도말하고, 동일한 조건 하에 성장시켰다. 세포를 EB20 배지에서 성장시켰다. 배양물을 매일 현미경 검사에 의해 평가하고, 비디오 카메라로 고동 세포를 기록하였다. 1주 동안 배양한 후, 생/사 검정을 수행하여 세포 생육도를 조사하였다. 또한, 면역조직화학을 수행하여 심장 관련 단백질의 존재를 입증하였다. 탈세포화 매트릭스 상에서 성장시킨 세포는 3 내지 4일까지 고동친 것으로 관찰된 반면, 젤라틴 상에서 성장시킨 세포는 고동치지 않았다. 5일까지는, 매트릭스 상의 세포가 팽창되었고, 보다 더 많은 면적의 고동 세포가 관찰되었다. 동일한 조건 하에 젤라틴 상에서 성장시킨 세포 상에서는 고동치는 것이 드물었거나 존재하지 않았다.

[0169] 실시예 6 - 재세포화 공정

[0170] 세포의 단리

[0171] 대략 심장의 가운데를 절단하면서, 월팅톤 프로토콜을 이용하여 래트 고름으로부터 LV 및 RV를 단리하였다. 기저부로부터 두 번째 LAD 가지까지의 부위를 벼리고, 나머지를 약 10 ml의 HBSS에 놓아두었다. 임의로는, 심장의 LV 및 RV 부분을 5°C 하에 18 내지 22시간 이하 동안 트립신에서 밤새 향온 배양할 수 있다. 탈세포화 매트릭스 내로의 주사를 위해 세포를 주사기 내로 뽑아낸 후에, 나머지 세포를 대조군으로서 사용하였다 (예를 들어, 10 ml 배지를 가하고, 세포를 도말하였다).

[0172] 세포와 매트릭스

[0173] 잘 세척된 탈세포화 세포와 매트릭스 (ECM)를 수득하였다. 예를 들어, 심장 세포와 매트릭스는 최소 2,000 ml의 PBS 용액을 이용하여 3 내지 4일 동안 세척하였다. 18 케이지 캐뉼라 (IN: LV 후 승모 판막; OUT: Ao)를 이용하여 심장에 캐뉼라를 삽입하고, 4-0 봉합사를 이용하여 단단히 고정시켰다. LV 캐뉼라는 LV 루멘 내의 꼭대기 근처까지 접근하였다 (예를 들어, LV 캐뉼라의 팀은 승모 판막으로부터 약 0.7 cm였다). 누출의 부재를 알아보기 위하여 형상을 검사하였다. 임의로는, "고속" 시험을 수행하여, 5 내지 10초 이상 동안 25 내지 28 ml/min의 [전-심장] 유동 프로브 범위 내로 펌프를 개시시킴으로써 모든 세포를 도입하기 전에 단단히 고정시킨 ECM 접속을 보장할 수 있다.

[0174] 세포 주사

[0175] 100 내지 120 ml 배지를 생물 반응기 내에 놓아두고, 60 mm 배양 판을 심장 꼭대기 아래에 놓아두어 과량의 세포를 잡아내고, 관상 폐쇄를 피하며, 열등한 변이 세포로부터의 세포소멸성 신호 전달을 피하였다. 27 케이지 바늘 및 1 cc TB 주사기를 이용하여 세포를 주사하였다. 대략 70 μ l의 세포를 1회 주사당 심실 벽 내로 주사하였는데, 바늘 도입 각은 표준으로부터 15도였다. 세포를 전방 LV 벽 내로 10 내지 12회 주사하였고, 심장 꼭대기 내로 3 내지 4회 주사하였다. 주사된 세포의 총 용적은 약 1.3 내지 1.5 ml여야 한다. 일부 역류 및 세포 손실이 예상된다. 심장은 생물 반응기 내로 낮추었고, 펌프 및 탱크 (95% O₂ 및 5% CO₂)를 작동시켰으며, 누출, 유동 문제점, 및 다른 모든 기술적 문제점을 알아보기 위하여 심장을 모니터링하였다. 그 다음날, 반응기를 개봉하고, 페이싱 리드 (pacing lead)를 부착하였다. 페이싱 (연속적)을 주파수: 1 Hz; 지연: 170 MS; 기간: 6 MS; 전압 범위: 45-60V; 유속 (IN): 18 내지 22 ml/min; 유속 (OUT): 14 내지 18 ml/min; diff 약 6 내지 7 ml/min 하에 시작하였다.

[0176] 배지

[0177] 다음 레시피는 1 리터에 대한 것이다. IMDM에, 100 ml FBS 10%; 5 ml Pen Strep; 10 ml L-Glut; 168 μ l Amp-B; 1 ml B-Mercap; 20 ml 말 혈청; 180 mg Ca²⁺; 96 mg Mg²⁺; 및 50 mg 비타민 C를 가한다.

[0178] NNCM (NEO) 세포

[0179] 신생아 심근세포 (NNCM 또는 NEO 세포)는 월팅톤 키트 프렙으로부터 수득하였다. NEO 세포는 온도 민감성이었는데, 온도가 약 35°C 아래로 떨어지면, 이를 세포 역시 고동하지 않았다. NEO 세포는 너무 밀집되지 않는다면 24시간 이내에 2D 판 상에서 고동치기 시작하였다. NEO 세포가 함께 성장하고 고동치기 때문에, 이들은 서로의 상부에서 성장하고 동시에 고동치기 시작하였으며, 궁극적으로 상기 세포는 자신을 기계적으로 제한하여 통상 10 내지 16일 사이에 고동을 중지할 것이다.

[0180] 실시예 7 - 탈세포화 및 재세포화 기관과 사체 기관의 구조적 비교

[0181] 도 19는 탈세포화 심장 (우측 패널)과 사체 심장 (좌측 패널)의 SEM 사진이다. SEM 사진은 좌심실 (LV) 및 우심실 (RV) 둘 다로부터 수득하였다. 이를 사진으로부터 알 수 있는 바와 같이, 관류-탈세포화 심장은 세포성 성분이 결여되어 있지만, 혈관 도관을 포함한 온전한 심근의 공간적 및 구조적 특징을 유지하고 있다. 또한, 관류-탈세포화 매트릭스에서는 세포의 완전한 손실에도 불구하고, 이러한 매트릭스 내에 직물 (w), 코일 (c) 및 지주 (s)를 포함한 구조적 특징이 보유되었다는 것을 관찰할 수 있다.

[0182] 도 20은 사체 래트 간 (좌측 패널)과 비교하여 본원에 기재된 바와 같이 탈세포화 및 재세포화된 래트 간 (우측 패널)의 조직학적 (상부) 및 SEM (바닥) 비교를 도시한 것이다. 이를 결과는 온전한 간으로부터의 건강한 간세포와 탈세포화 간 상에서 배양되거나 시당된 간세포 간의 형태학적 유사성 및 구조적 구성을 예시하고 있다. H&E 영상은 재세포화 간 내의 세포가 혈관 도관 주변에 방사상 방식으로 구성되거나 시작하였다는 것을 보여주는

데, 이는 신선하게 단리된 건강한 (사체) 간에서 관찰된 구조와 유사하다. 세포가 실질 전반에 걸쳐 분포되고/되거나 이동하고, 구성하기 시작하며, 실험이 지속되는 한은 매트릭스 내에 유지된다는 것을 또한 예시한다. SEM 영상은 심지어 초미세구조 수준 하에서도 사체 매트릭스와 재세포화 매트릭스 내에서의 세포성 구조 상의 유사성을 입증해준다.

[0183] 섹션 E. 관류에 의한 탈세포화 대 침지에 의한 탈세포화

[0184] 실시예 1 - 침지를 이용한 탈세포화

[0185] 본원에 기재된 관류 방법을 이용하여 기관 (래트 간, 신장, 심장, 폐, 근육, 피부, 뼈, 뇌 및 혈관계; 돼지 간, 방광, 신장 및 심장)을 탈세포화시켰다.

[0186] 미국 특허 제6,753,181호 및 제6,376,244호에 기재된 침지 방법을 이용하여 기관 (래트 간, 심장 및 신장)을 탈세포화시켰다. 간략하게 언급하면, 기관을 dH_2O 에 놓아두고, $4^{\circ}C$ 하에 48시간 동안 100 rpm으로 회전하는 자기 교반봉을 이용하여 진탕시킨 다음, 용액을 자기 교반봉으로 연속적으로 교반시키면서 (100 rpm) 48시간 동안 수산화암모늄 (0.05%) 및 트리톤 X-100 (0.5%) 용액에 상기 기관을 끓겼다. 이 용액을 변화시키고, 수산화암모늄 및 트리톤 X-100를 이용한 48시간 침지를 필요한 만큼 반복하여 해당 기관 (일반적으로, 가시적 비세포성 기관)을 탈세포화시켰다. 간을 대상으로 하여 수산화암모늄 및 트리톤 X-100 침지를 대략 5회 반복하여 가시적으로 비세포성 기관을 생성시켰다. 탈세포화 공정 후, 기관을 48시간 동안 진탕시키면서 (100 rpm 하에 다시 교반시킨다) dH_2O 에 끓기고; 마지막으로, $4^{\circ}C$ 하에 PBS를 이용하여 최종 세척을 수행하고, 교반하였다.

[0187] 실시예 2 - 관류 대 침지의 비교

[0188] 도 21a는 관류 탈세포화시킨 돼지 간의 사진을 나타내고, 도 21b 및 21c는 관류 탈세포화된 돼지 간의 혈관 및 실질 매트릭스의 SEM을 각각 나타낸다. 이를 사진은 관류 탈세포화 기관의 혈관 도관 및 매트릭스 완전성을 나타낸다. 한편, 도 22는 침지 탈세포화 래트 간의 총괄 전망을 나타내는데, 매트릭스의 닳아 해어짐이 저 배율 (좌측) 및 고 배율 (우측) 둘 다에서 관찰될 수 있다.

[0189] 도 23은 침지 탈세포화 래트 간 (a 및 b) 및 관류 탈세포화 래트 간 (c 및 d)의 SEM을 나타낸다. 이를 결과는 침지 탈세포화가 기관 캡슐 (글리송 캡슐)을 상당히 손상시키는 반면, 관류 탈세포화는 캡슐을 보존시켰다는 것을 명백히 나타낸다. 또한, 도 24는 침지 탈세포화 간의 조직학 (a, H&E 염색; b, 삼색 염색) 및 관류 탈세포화 간의 조직학 (c, H&E 염색; d, 삼색 염색)을 도시한다. 침지 탈세포화 래트 간은 주사 시 세포 또는 염료를 유지하지 못하였다.

[0190] 도 25는 래트 심장의 침지 탈세포화 (상부 열)와 관류 탈세포화 (바닥 열) 간의 비교를 도시한 것이다. 좌측 칼럼 내의 사진은 전체 기관을 나타낸다. 2개 사진으로부터 알 수 있는 바와 같이, 관류 탈세포화 기관 (바닥 좌측)은 사체 근육 조직의 철-풍부 "적갈색"을 유지하고 여전히 세포를 함유하는 것으로 보이는 침지 탈세포화 기관 (상부 좌측) 보다 훨씬 더 반투명하다. 중앙 칼럼 내의 사진은 탈세포화 조직의 H&E 염색 패턴을 나타낸다. 이 염색은 실질 내에 있는 세포와 혈관계 벽 내에 있는 세포 수가 침지 탈세포화 (상부 중앙) 후에도 유지되는 반면, 거의 모든 세포 및 또한 세포성 부스러기는 명백한 혈관 도관이 눈에 띄는 바로 그 순간에 관류 탈세포화 (바닥 중앙)에 따라 제거된다는 것을 보여준다. 또한, 우측 칼럼 내의 스캐닝 전자 현미경사진은 침지 (상부 우측) 대 관류 (바닥 우측) 탈세포화에 따른 매트릭스의 초미세구조 간에는 상당한 차이가 있다는 것을 보여준다. 다시 언급하면, 심근 단면적 전반에 걸친 세포성 성분의 완전한 체류가 침지 탈세포화 심장의 모든 벽에서 관찰되었지만, 혈관 도관을 포함한 온전한 심근의 공간적 및 구조적 특징의 보존과 함께 이들 세포성 성분의 거의 완전한 손실이 관류-탈세포화 심장에서 관찰되었다. 예를 들어, 관류-탈세포화 매트릭스는 세포의 완전한 손실에도 불구하고, 직물 (w), 코일 (c) 및 지주 (s)를 포함한 매트릭스 내의 구조적 특징을 유지하였다.

[0191] 도 26은 래트 신장을 이용한 동일한 비교 [침지 탈세포화 (상부 열) 대 관류 탈세포화 (바닥 열)]를 도시한 것이다. 심장과 달리, 침지-탈세포화 전체 신장 (상부 좌측)은 둘 다가 꽤 반투명성이라는 점에서 관류-탈세포화 전체 신장 (바닥 좌측)과 전반적으로 유사한 것으로 보인다. 그러나, 관류-탈세포화 신장에서는 관류-탈세포화 기관 내의 혈관 도관의 네트워크가 더 뚜렷하고, 더 큰 분지도가 침지-탈세포화 구조물에서보다 가시적일 수 있다. 더우기, 관류-탈세포화 신장은 온전한 기관 캡슐을 보존하고 있고, 장간막에 의해 둘러싸여 있으며, 도시된 바와 같이 부착된 부신과 함께 탈세포화될 수 있다. 중앙 칼럼 내의 사진은 두 조직의 H&E 염색 패턴을 보여준다. 이 염색은 세포성 성분 및/또는 부스러기 및 가능하게는 심지어 온전한 핵 (퍼풀 염색)이 침지-탈세포화

화 (상부 중앙) 후에 보존된 반면, 거의 모든 세포 및/또는 모든 세포성 부스러기는 관류-탈세포화 (바닥 중앙) 후에 제거된다는 것을 나타낸다. 마찬가지로, SEM 사진은 침지-탈세포화 신장 매트릭스 (상부 우측)이 관류-탈세포화 신장 매트릭스 (바닥 우측) 보다 훨씬 더 손상에 시달렸다는 것을 입증해준다. 침지-탈세포화 신장에서는, 기관 캡슐이 생략되거나 손상되므로, 매트릭스의 표면 "구멍" 또는 닳아 해어짐이 명백한 반면, 관류 탈세포화 기관에서는 캡슐이 온전하다.

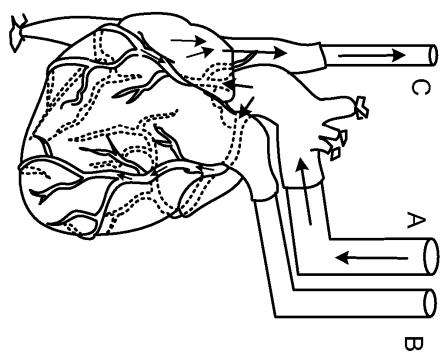
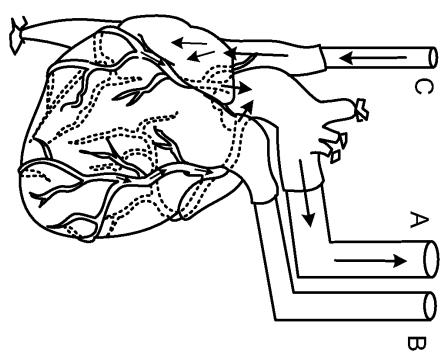
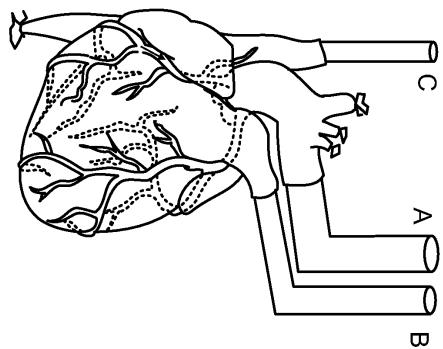
[0192] 도 27은 탈세포화 신장의 SEM 사진을 나타낸다. 도 27a는 관류-탈세포화 신장을 나타내는 반면, 도 27b는 침지-탈세포화 신장을 나타낸다. 도 28a는 관류-탈세포화 심장의 SEM 사진을 나타내는 반면, 도 28b는 침지-탈세포화 심장의 SEM 사진을 나타낸다. 도 29는 침지-탈세포화 간의 SEM 사진을 나타낸다. 이들 영상은 침지-탈세포화가 해당 기관의 초미세구조에 유발시켰던 손상, 및 관류-탈세포화 후의 매트릭스의 생육성을 추가로 입증해준다.

[0193] 다른 실시양태

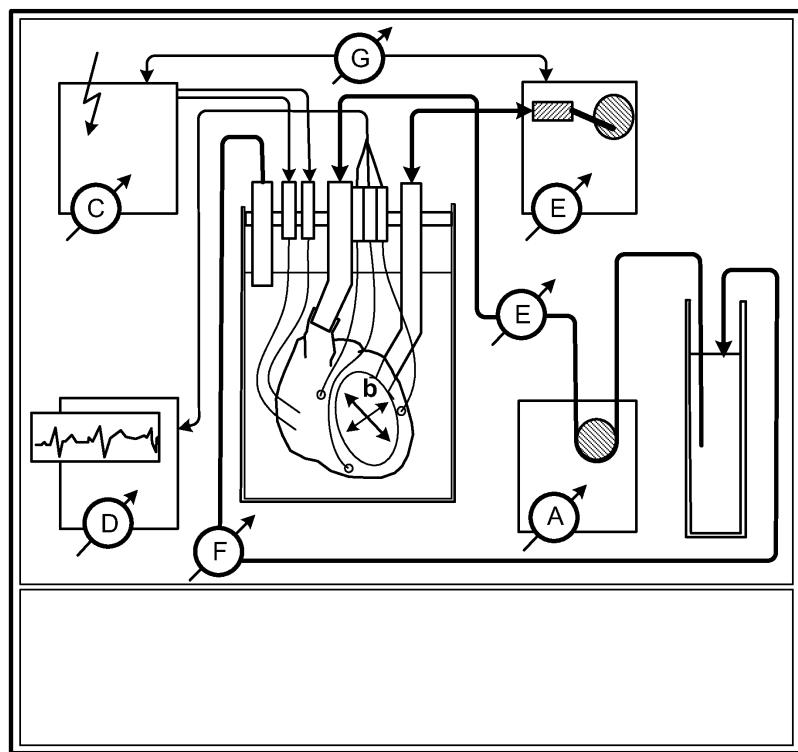
[0194] 본 발명이 그의 상세한 설명과 연계해서 기재되긴 하였지만, 전술 내용은 예시적이고 본 발명의 범위를 제한하지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부된 특허청구범위에 의해 규정된다는 것을 인지해야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형이 다음 특허청구범위 내에 있다.

도면

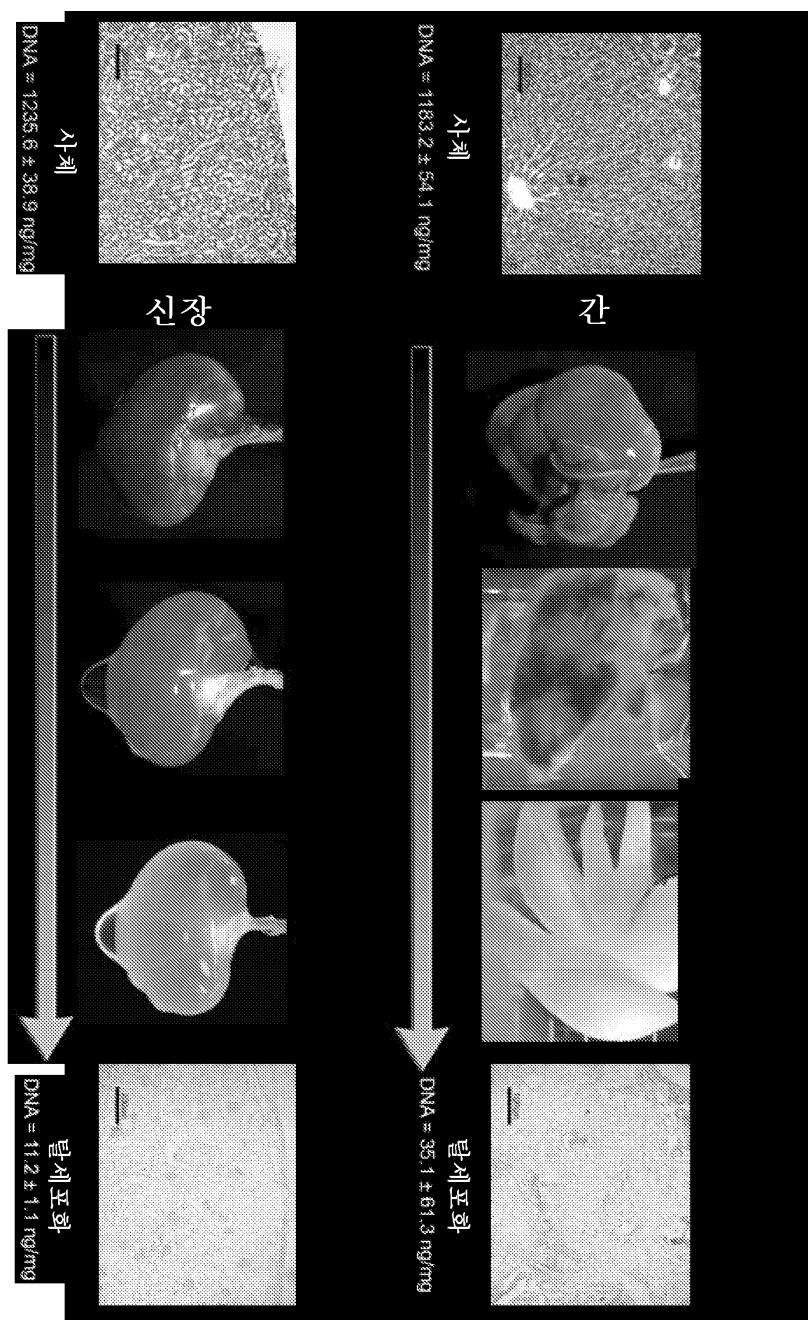
도면1



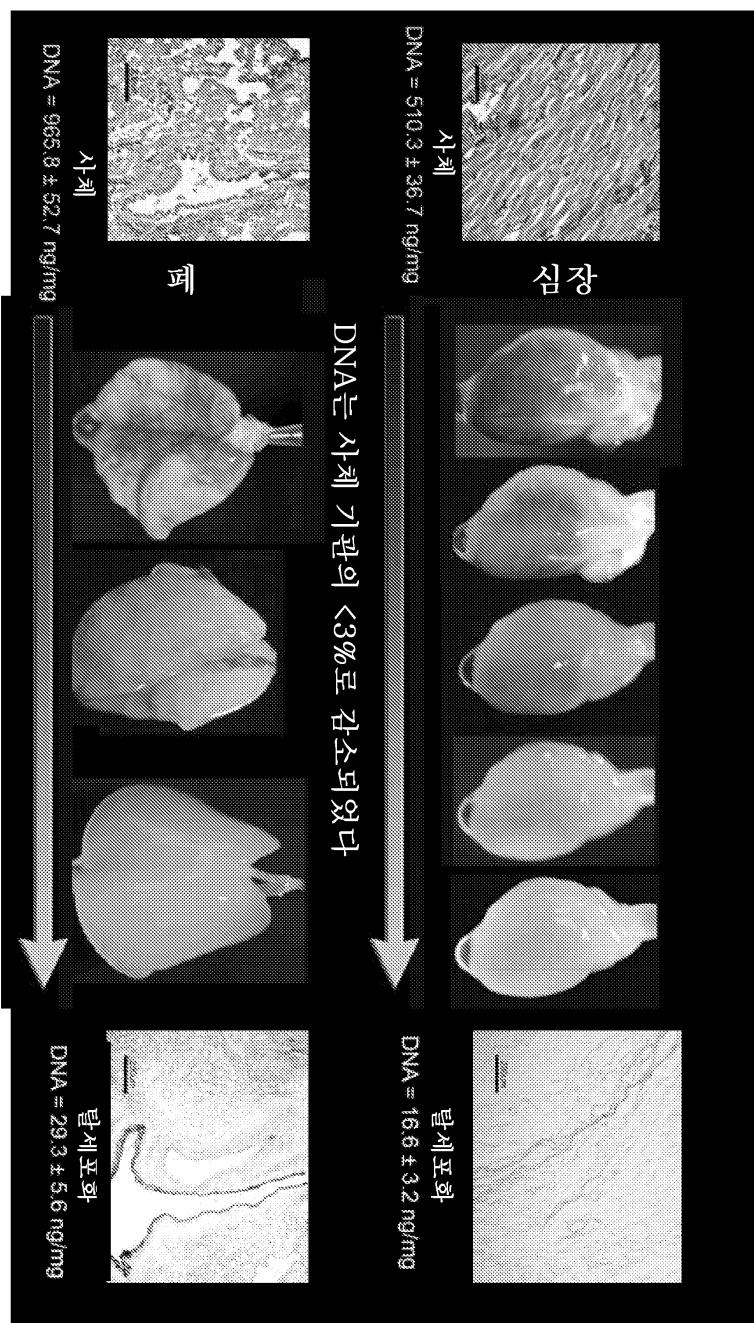
도면2



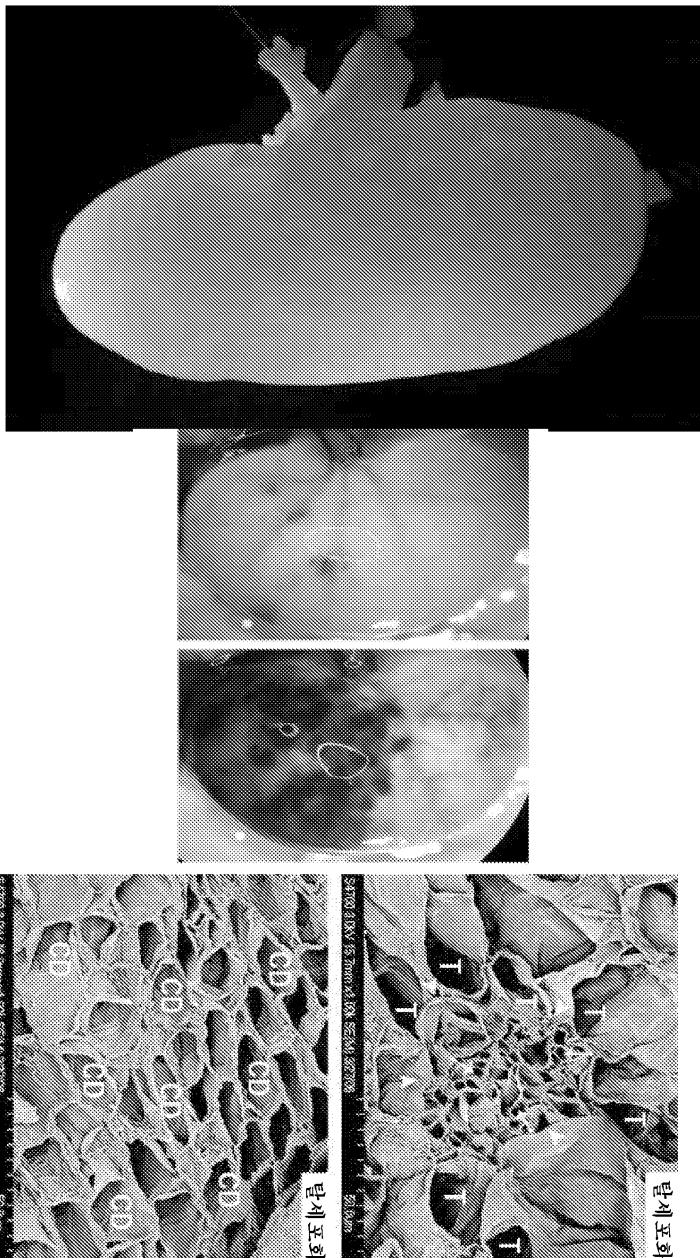
도면3a



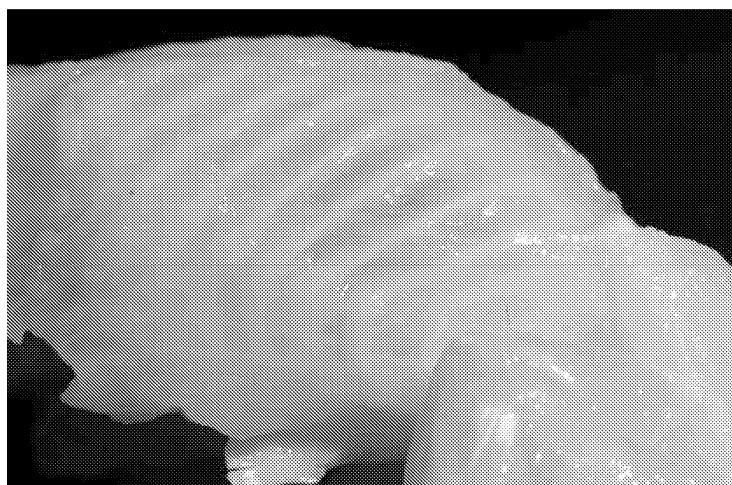
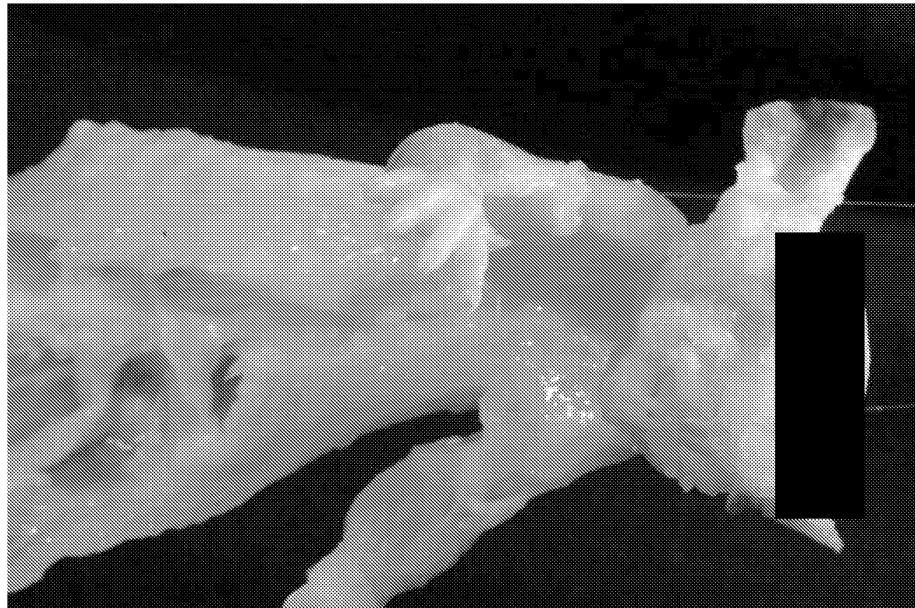
도면3b



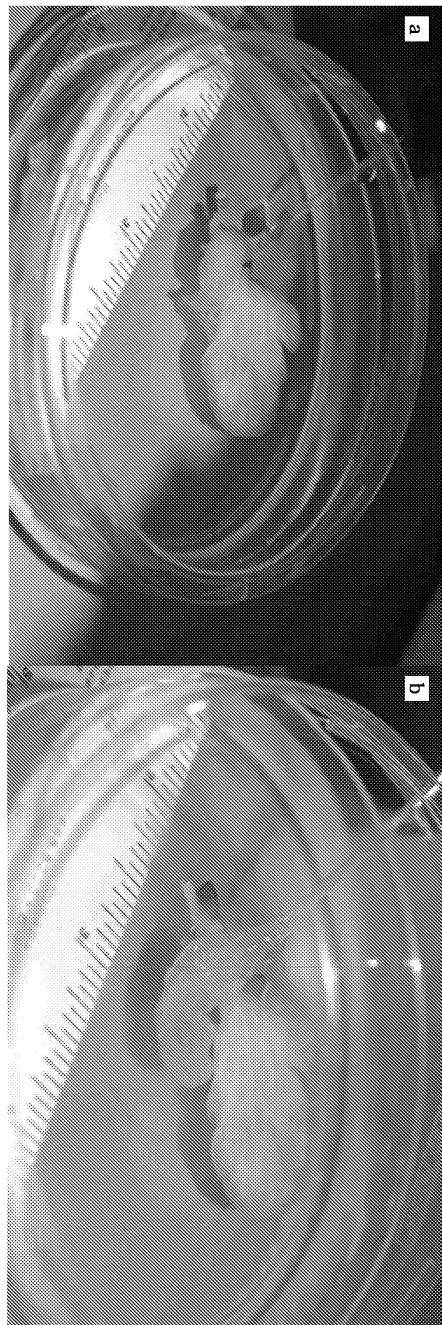
도면4



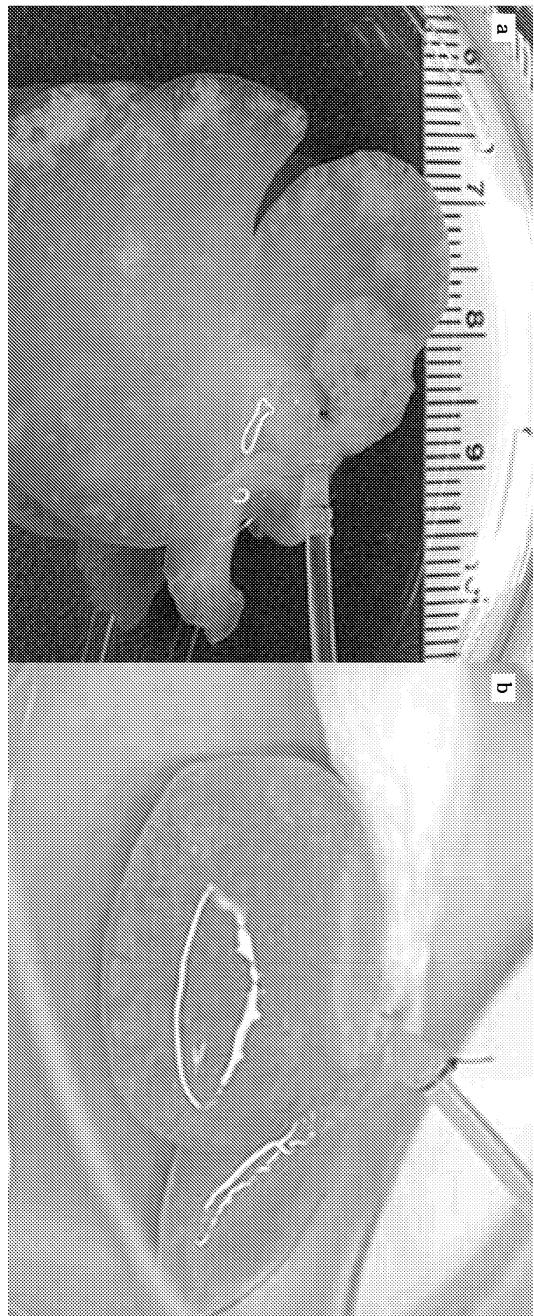
도면5



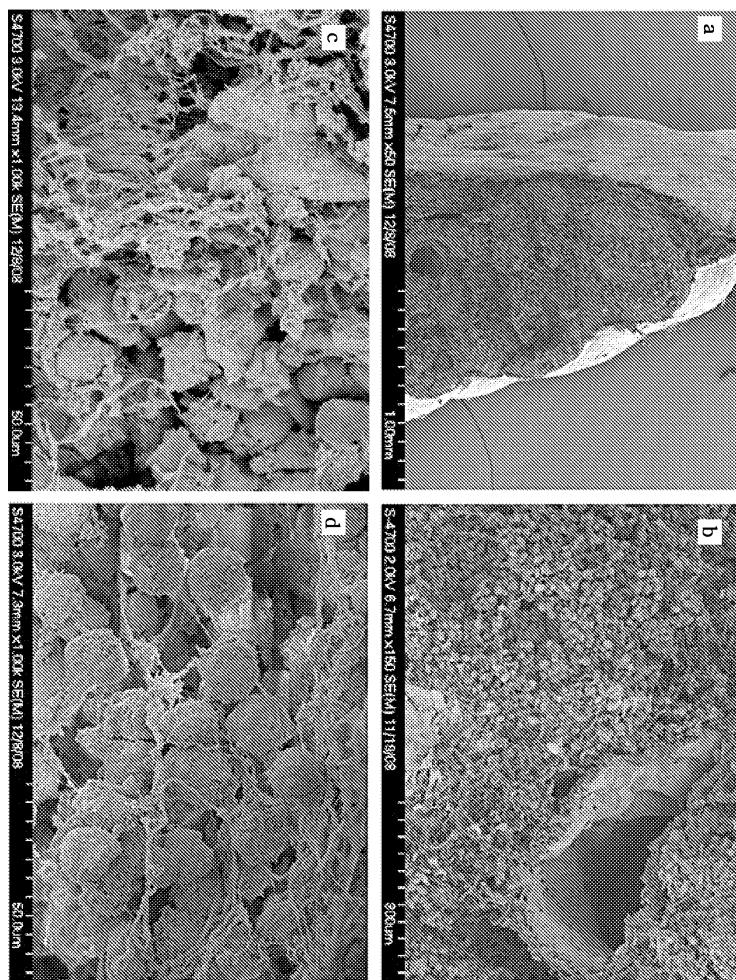
도면6



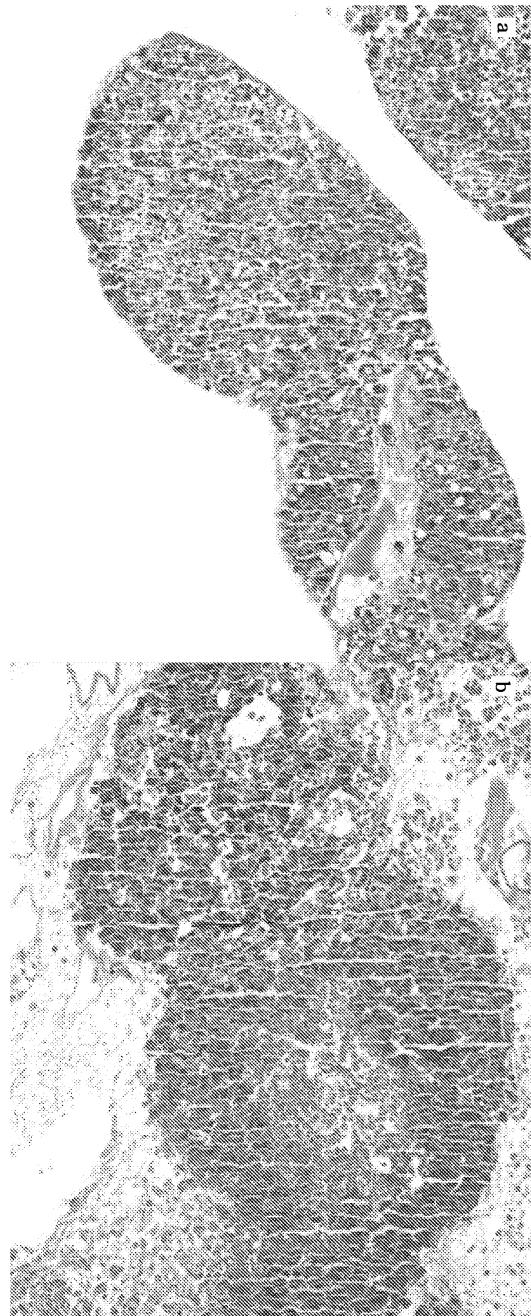
도면7



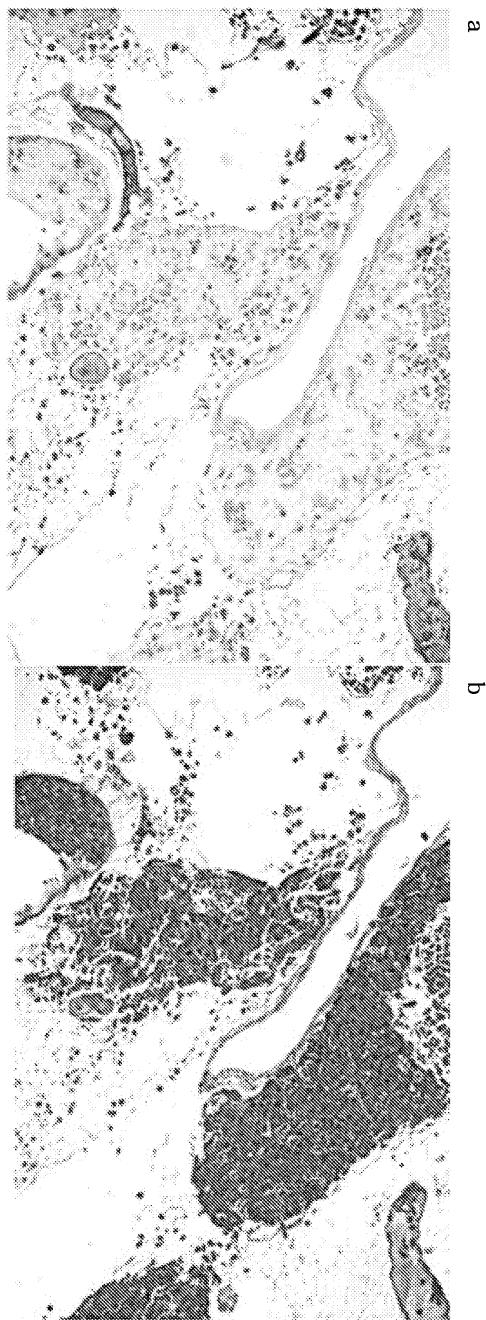
도면8



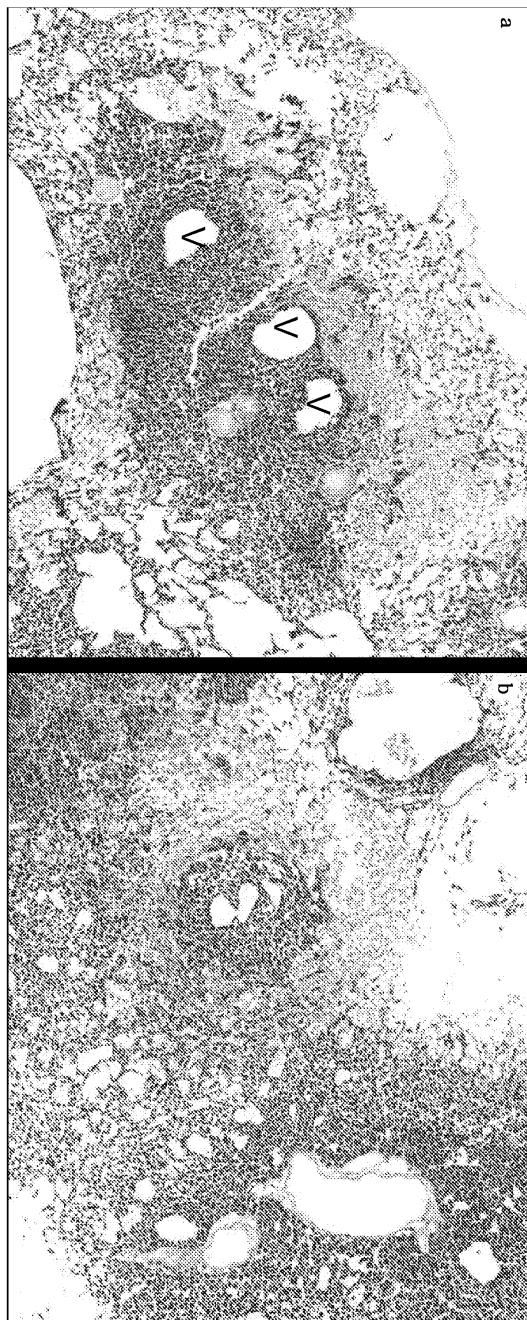
도면9



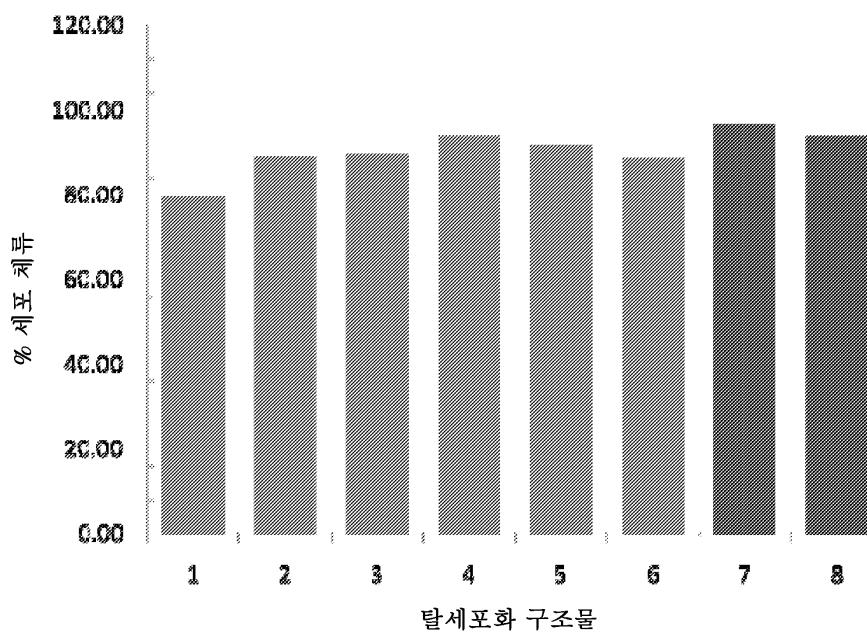
도면10



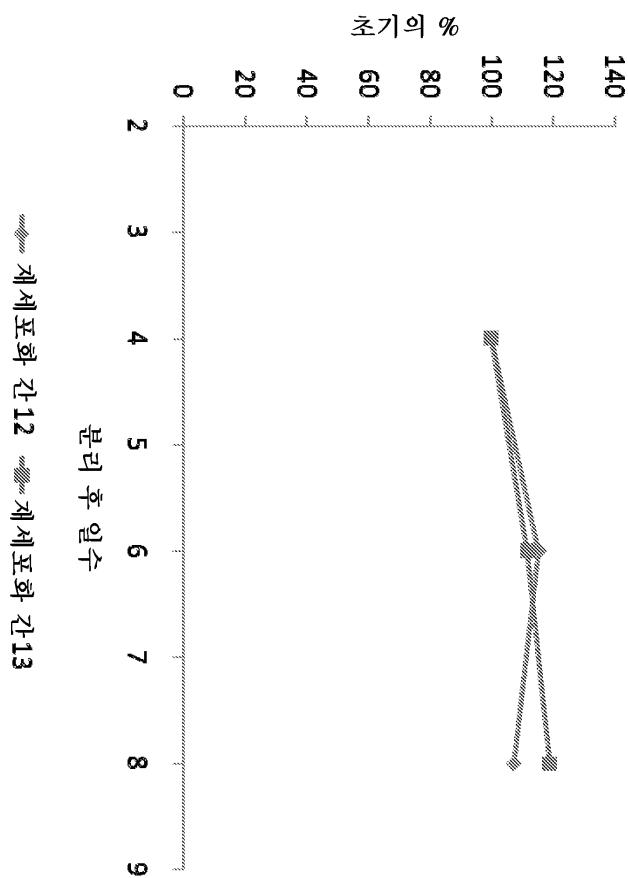
도면11



도면12

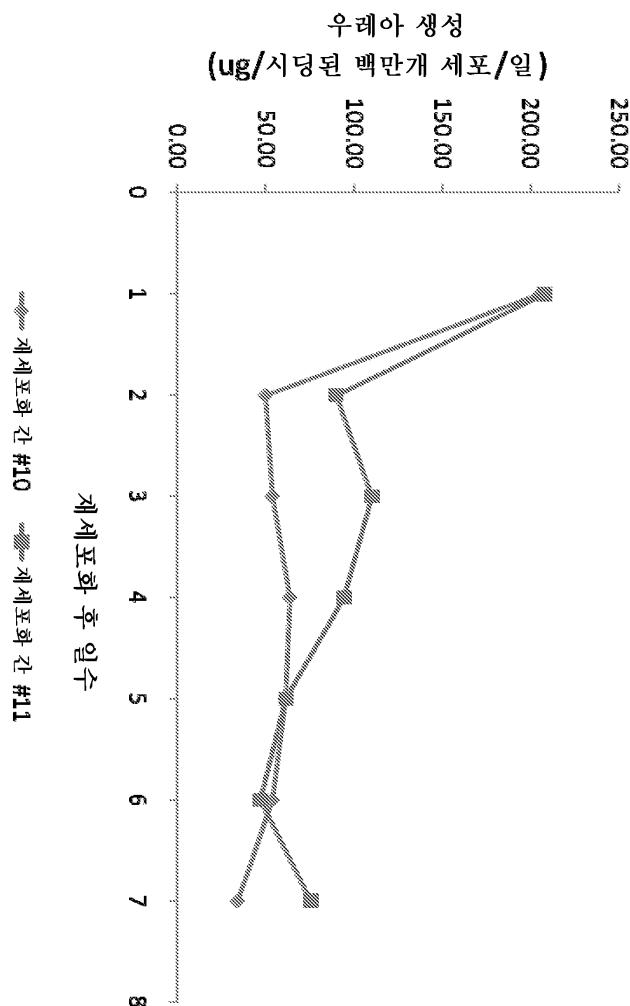


도면13

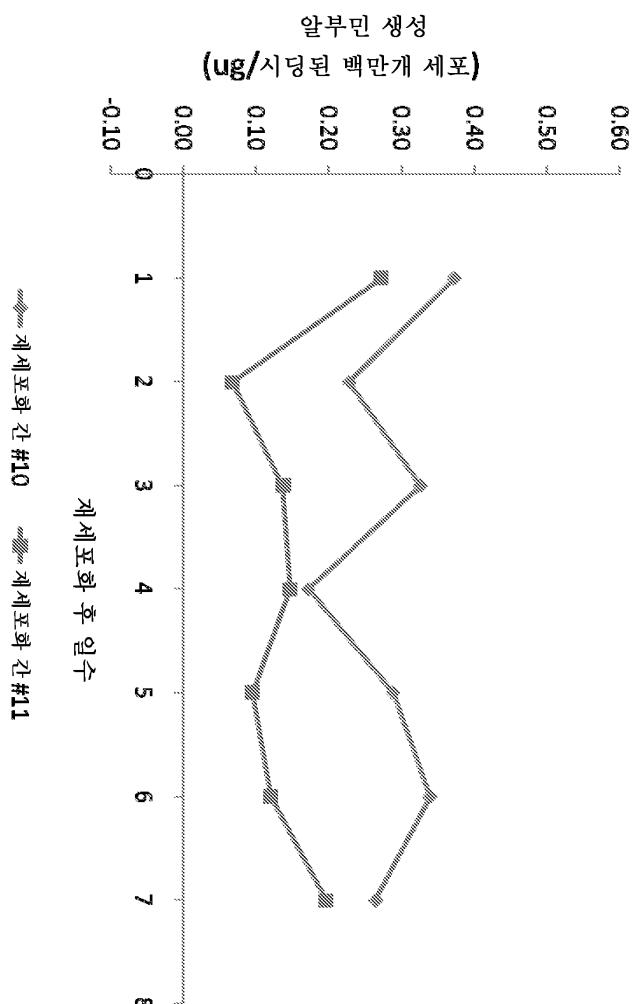


—●— 제 112 —●— 제 113

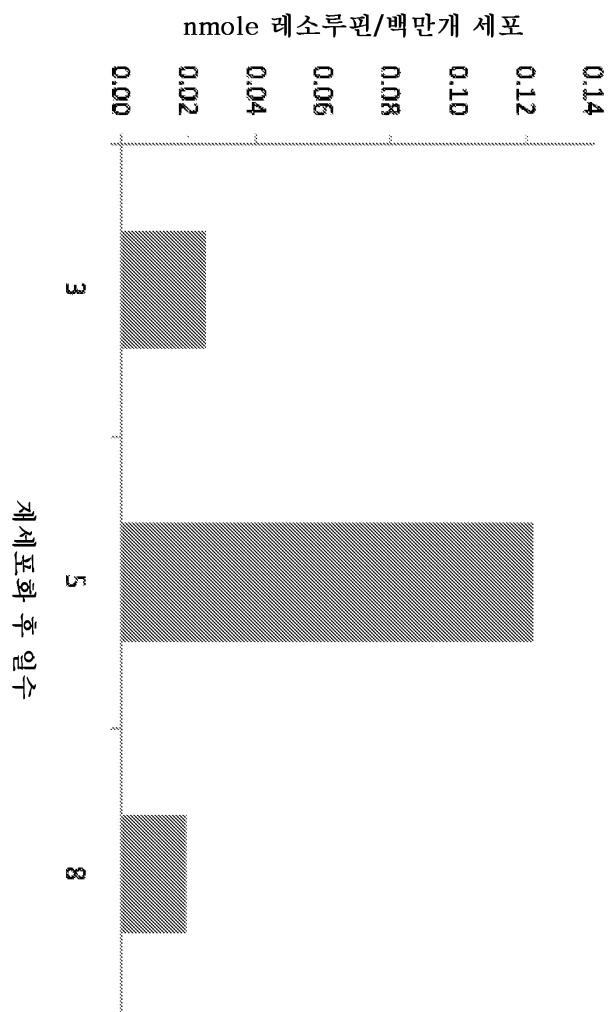
도면14



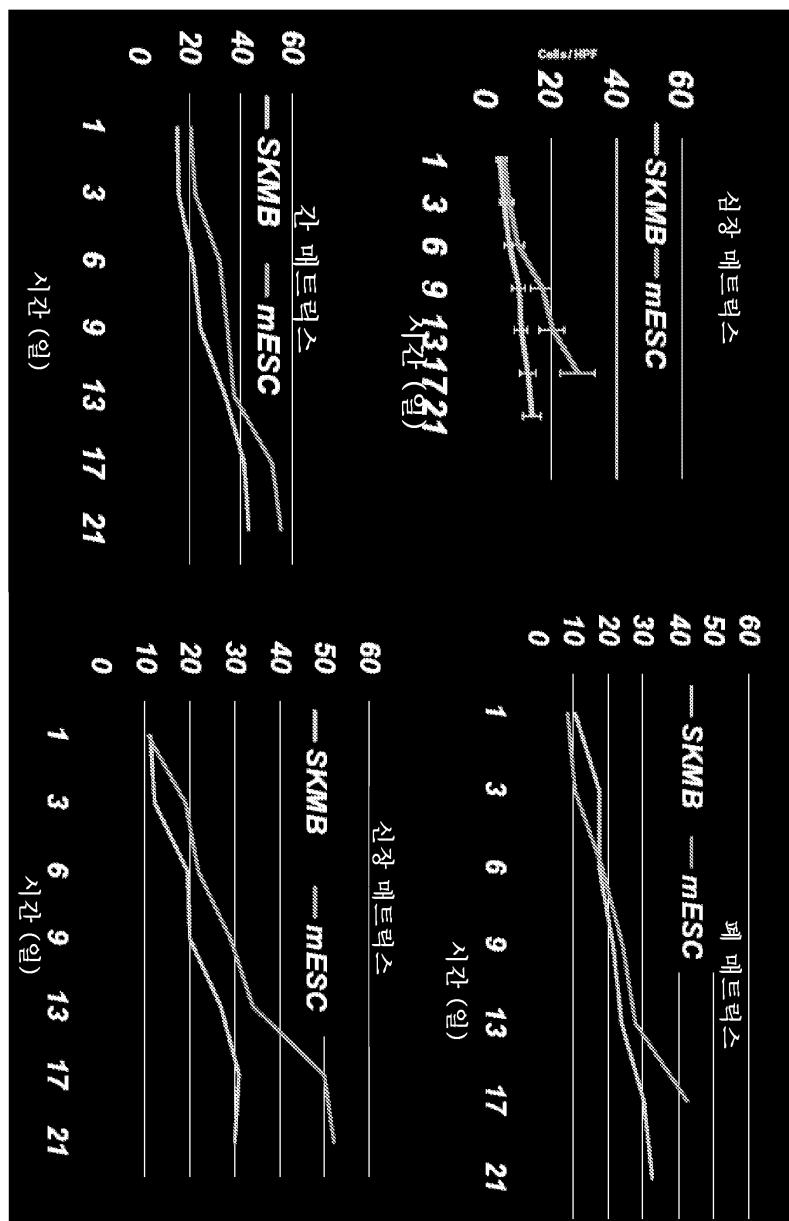
도면15



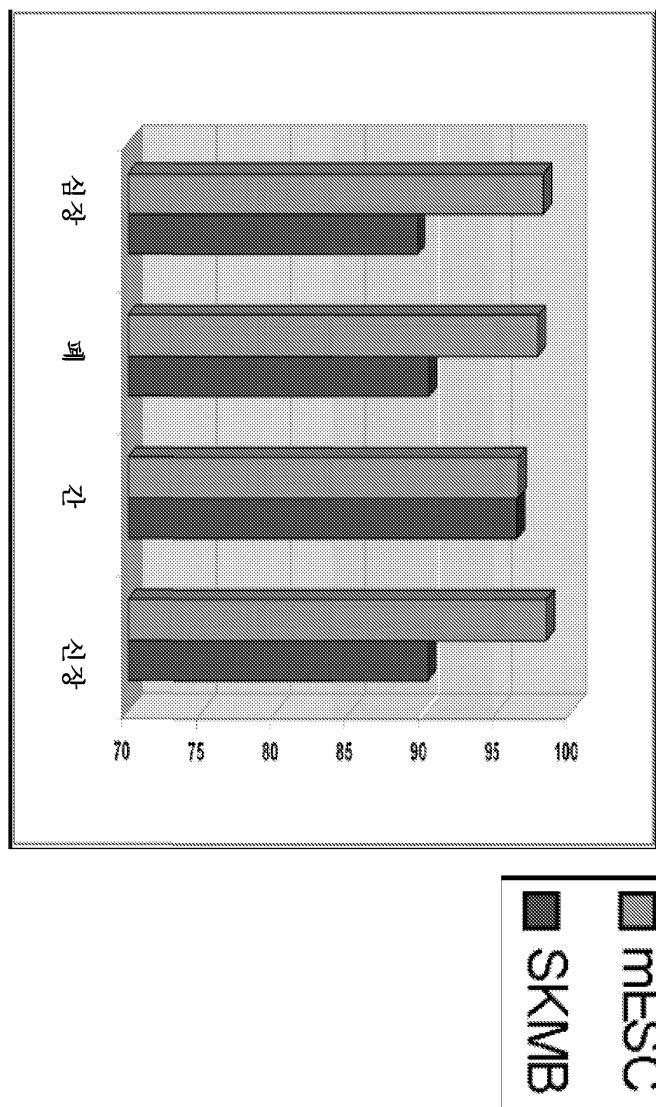
도면16



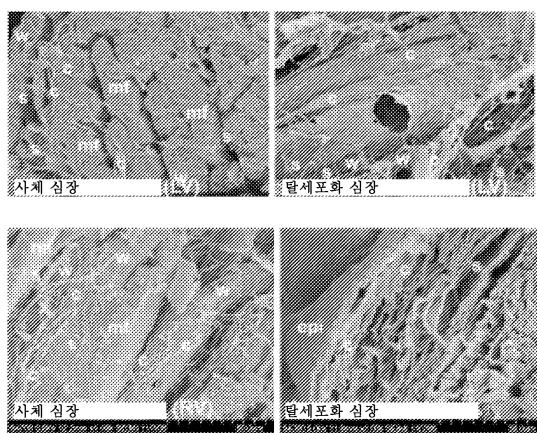
도면17



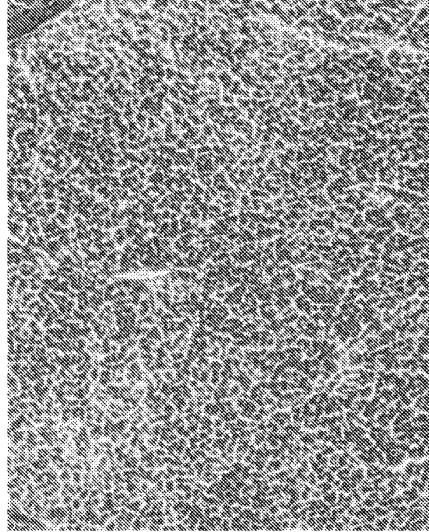
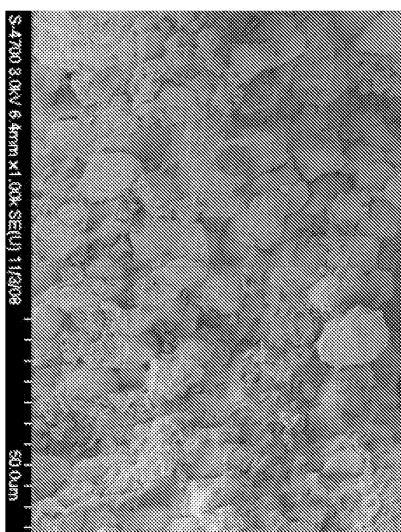
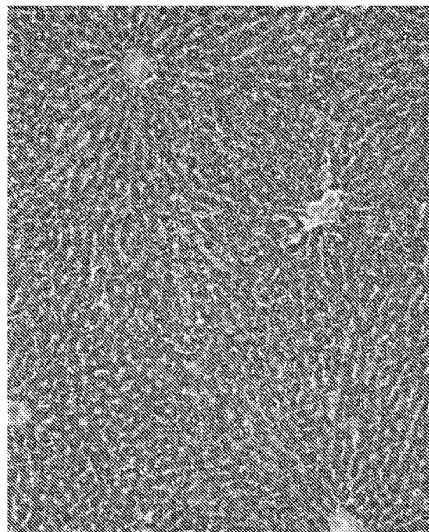
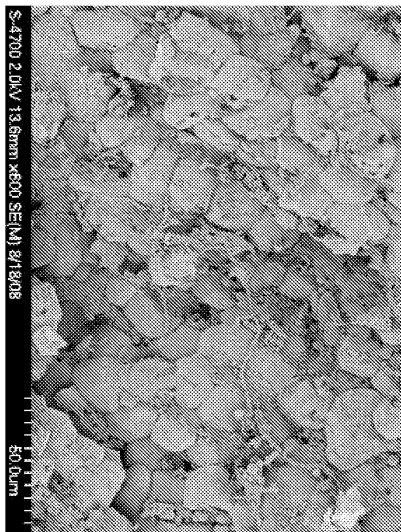
도면18



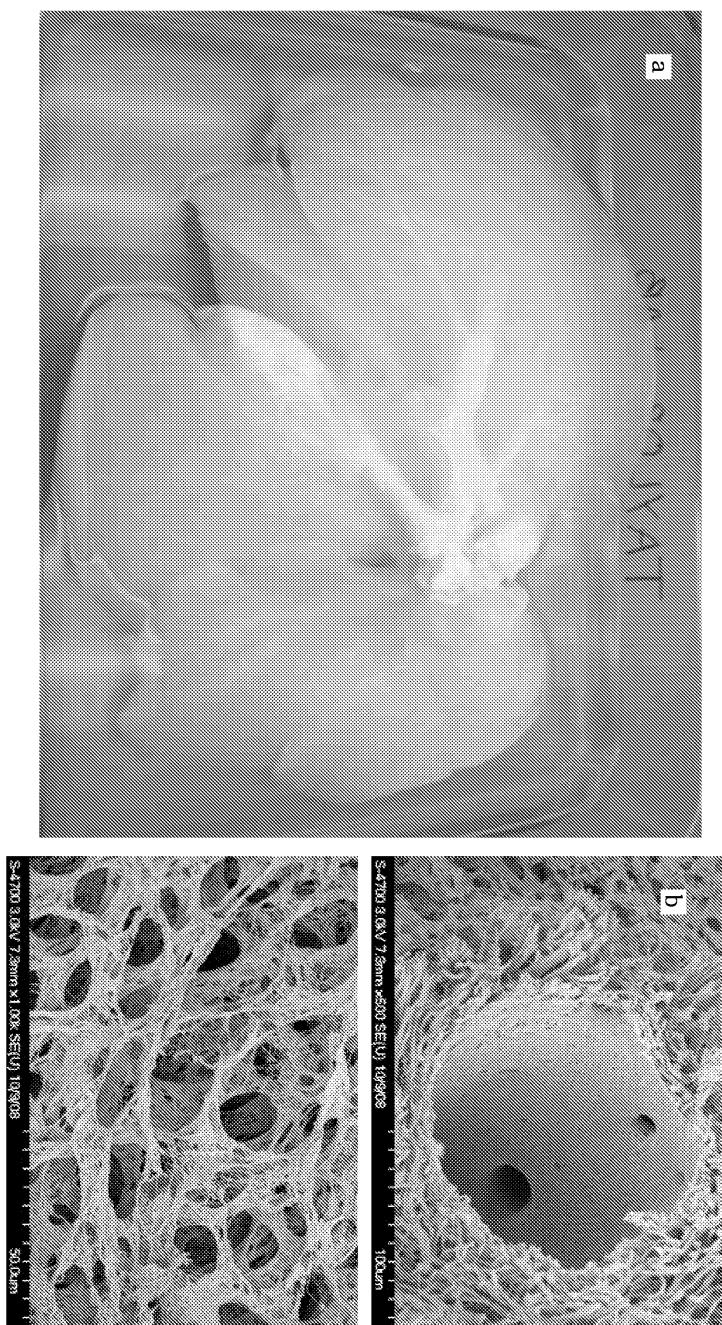
도면19



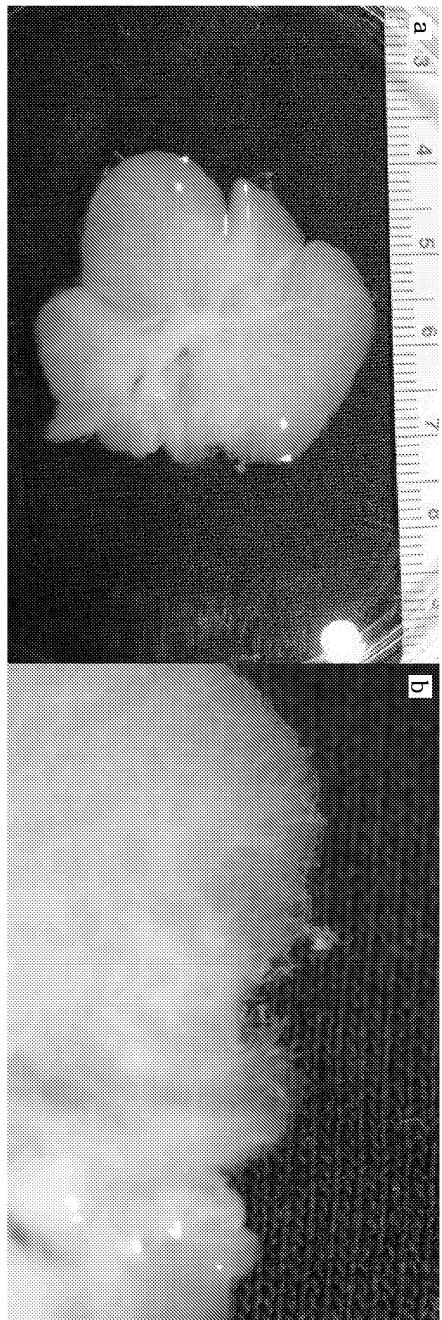
도면20



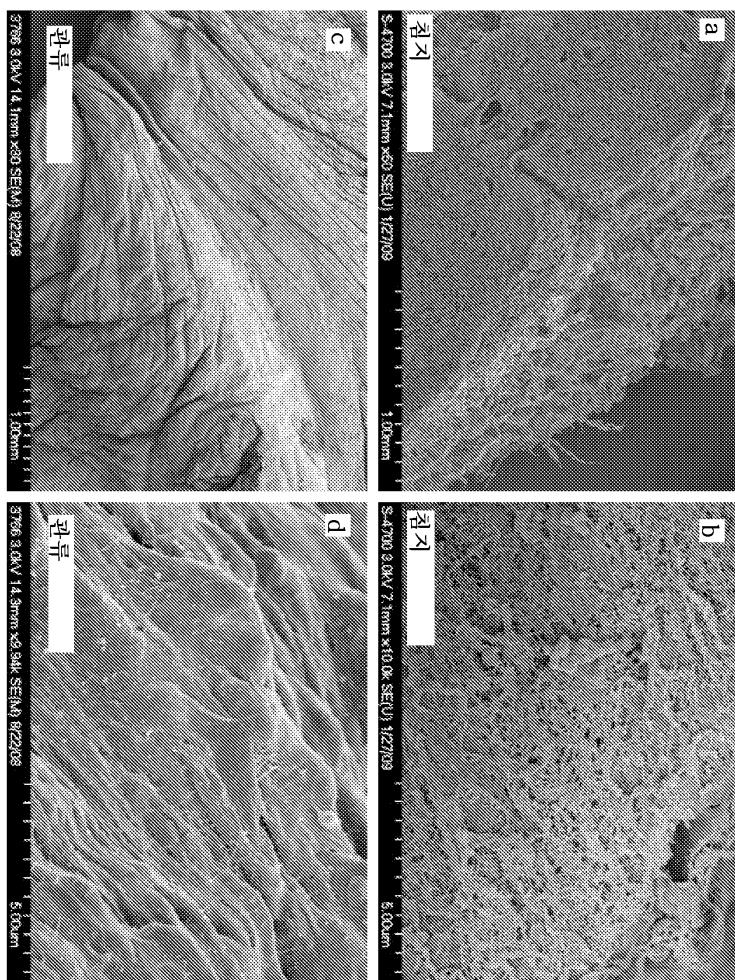
도면21



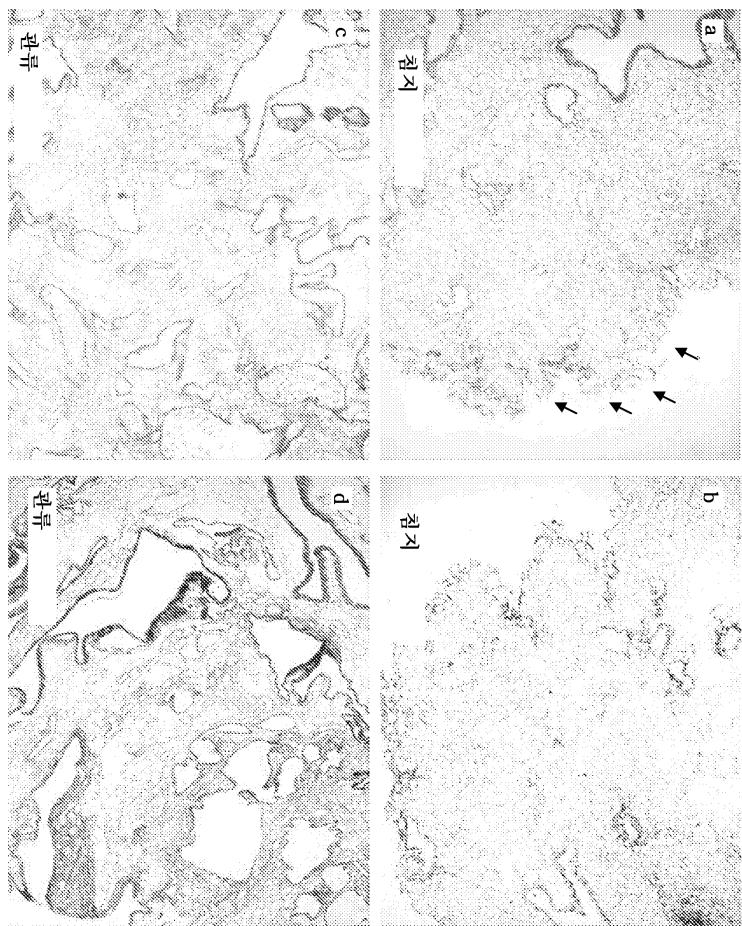
도면22



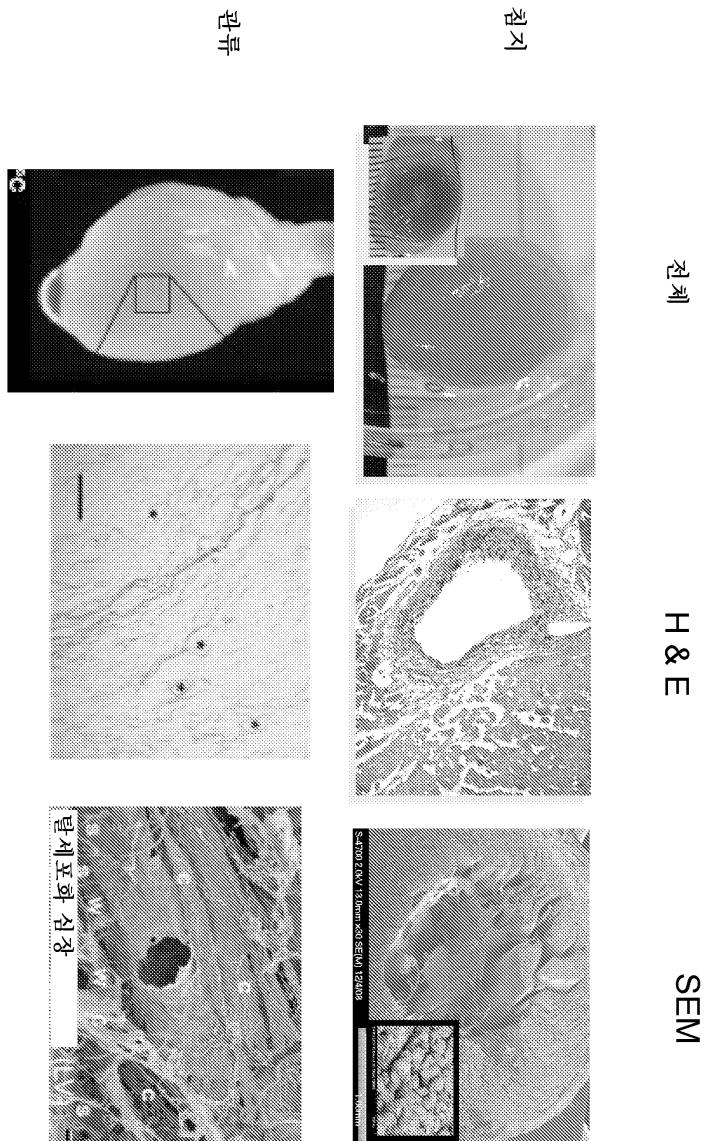
도면23



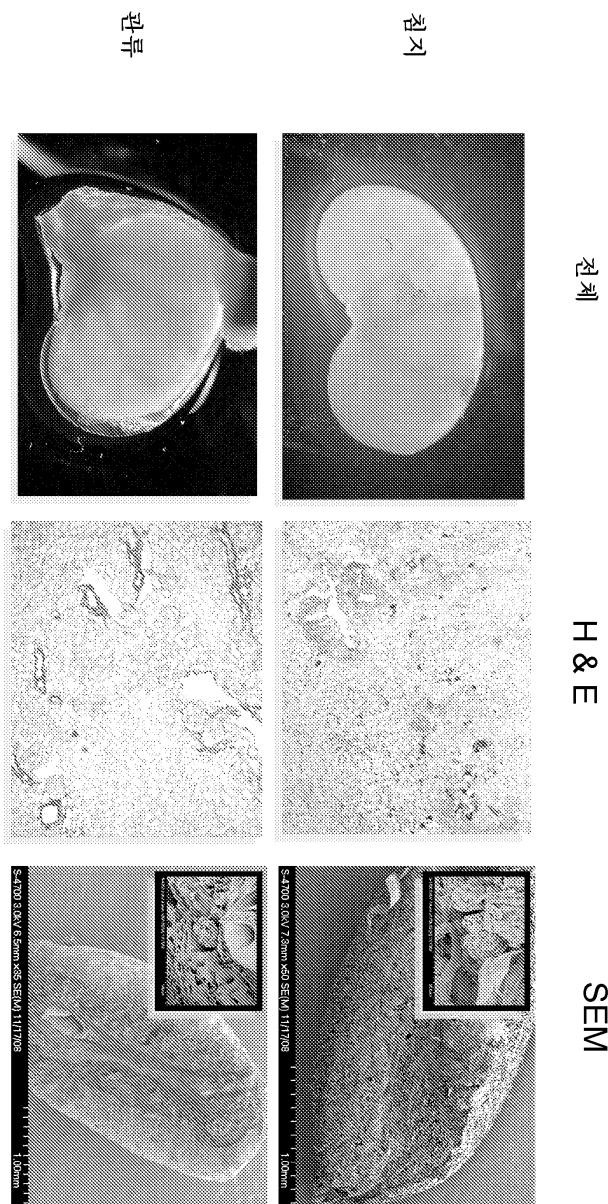
도면24



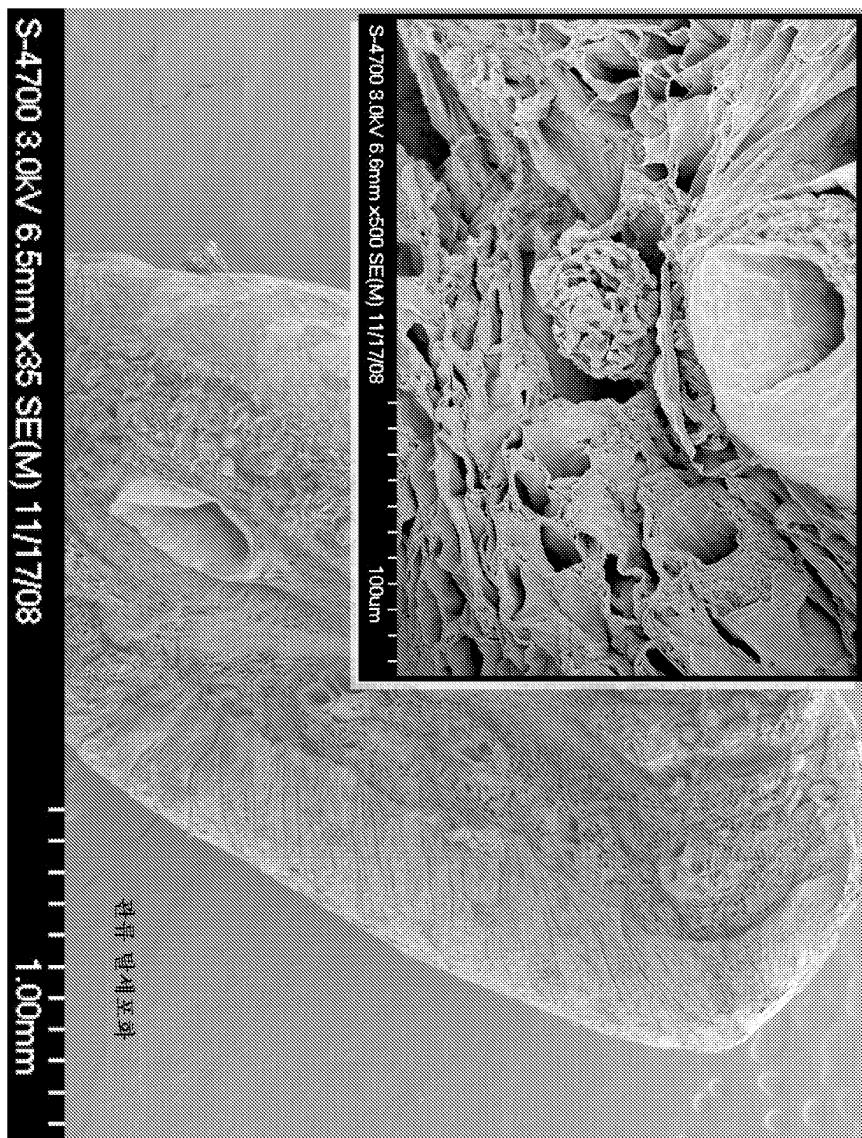
도면25



도면26

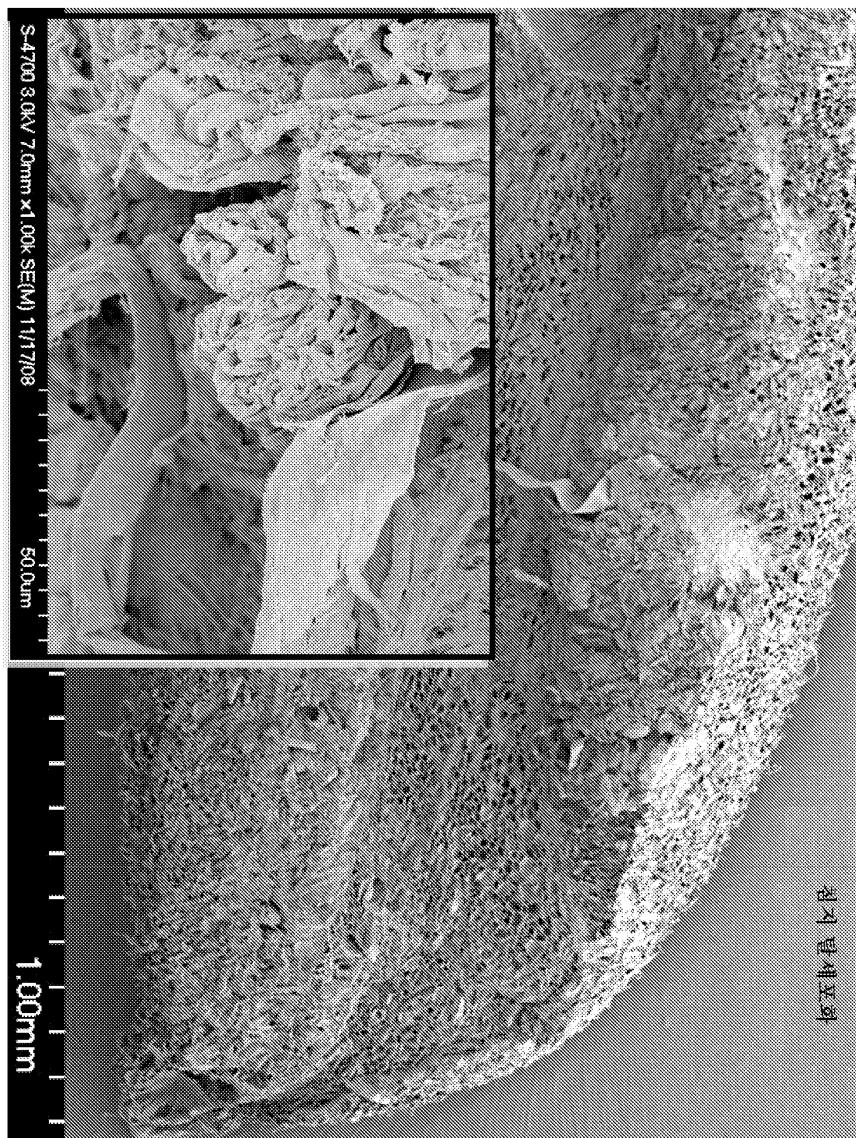


도면27a

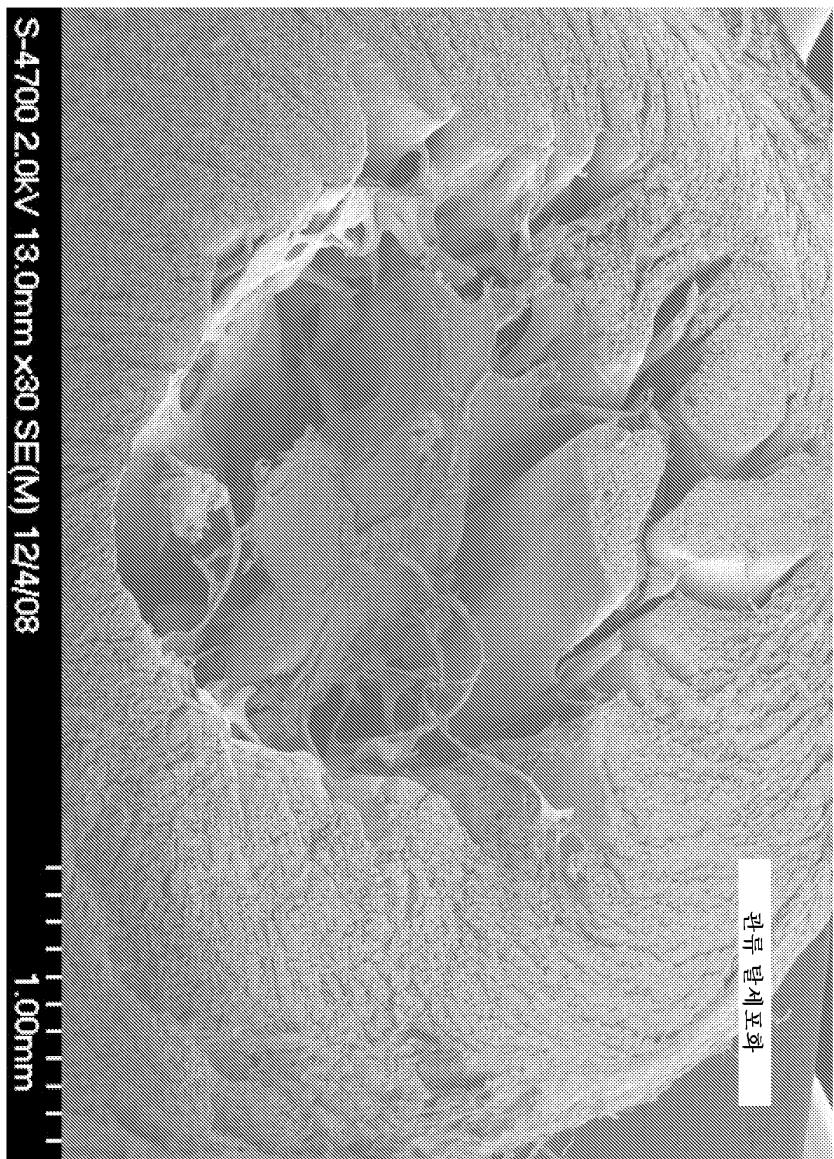


S-4700 3.0kV 6.5mm x35 SE(M) 11/17/08

도면27b



도면28a

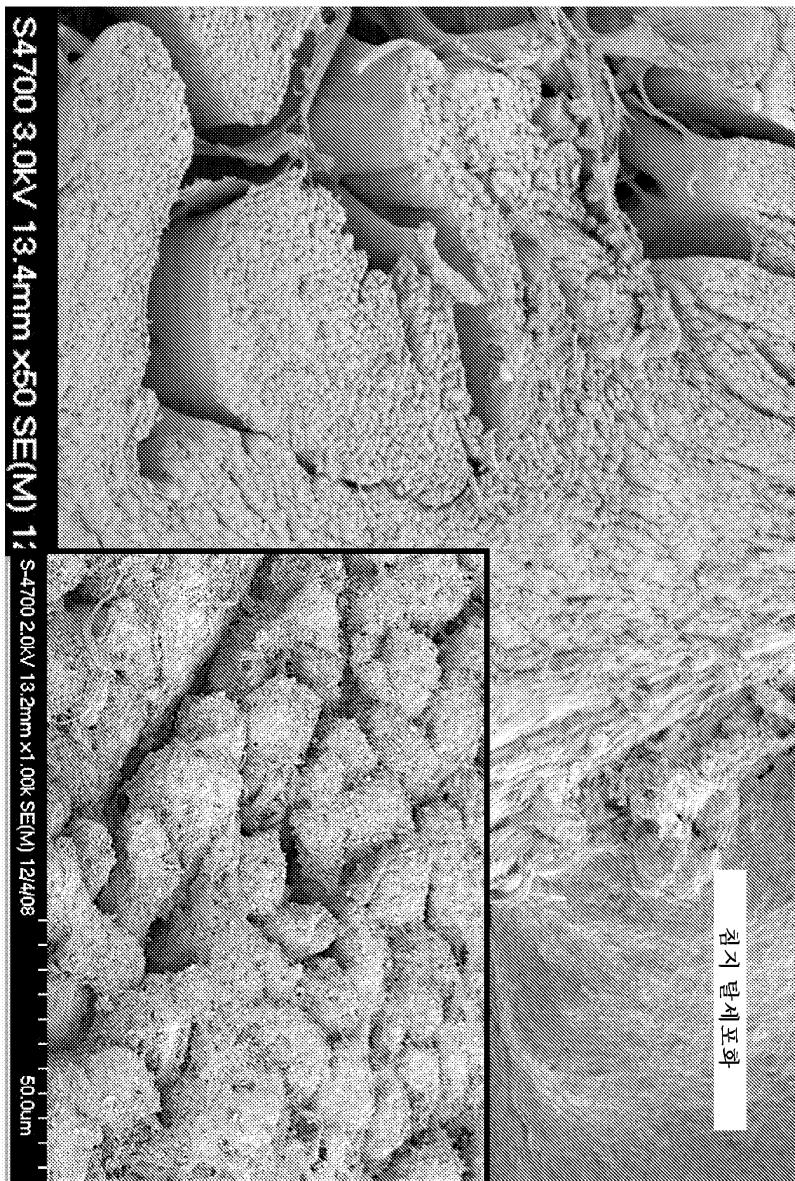


S-4700 2.0kV 13.0mm x30 SE(M) 12/4/08

1.00mm

관류 털체 포화

도면28b



도면29

