(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 38/18

(11) 공개번호 10-2004-0008125
(43) 공개일자 2004년01월28일

(21) 출원번호 10-2003-7010108
(22) 출원일자 2003년07월30일
번역문 제출일자 2003년07월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/002640
(87) 국제공개번호 WO 2002/60315
(86) 국제출원출원일자 2002년01월30일
(87) 국제공개일자 2002년08월08일

(30) 우선권주장 60/265,053 2001년01월30일 미국(US)
60/265,064 2001년01월30일 미국(US)

(71) 출원인 오르쏘젠 인크.
미국 캘리포니아주 94904 그린브레 스위트 407 본 에어 센터 336

(72) 발명자 훈지커에른스트비.
스위스체하-4533레이트홀쯔손넨라이언32

(74) 대리인 김두규

심사청구 : 없음

(54) 활액 유도된 조직 또는 세포를 사용하여 관절 연골 내의결함 또는 병변을 치료 및 수복하기 위한 조성물 및 방법

요약

본 발명은 동물 및 사람 내의 연골 결함을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 활액 결함을 충전시키는 데 사용하기 위한 활액 조직, 활액 세포 및 활액(또는 형성층) 조직을 함유하는 기질을 포함한다. 기질 및 활액 조직 또는 세포 제제는 또한 치유를 촉진시키는 증식제, 변형 인자 또는 활성 제제를 함유할 수 있다. 방출 제어형 전달 시스템은 변형 인자를 투여하는 데 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 연골 결함을 피복하기 위해서 활액 피복 막 또는 제활력화된 근막 시이트를 포함한다. 또한, 본 발명의 방법은 최소한 침습성 외과술 간섭이 수행되어 관절로부터 활액 막의 작은 부분이 제거되는 경우에 이용된다. 활액 막의 일부 또는 시험관내에서 증대된 세포는 단독으로 결함 부위 내로 이식되거나 또는 기질와 함께 결함 부위 내로 이식되며, 여기서 상기 활액 막의 일부와 시험관내에서 증대된 세포는 새로운 연골 조직을 생성시키고 결함을 수복시킨다. 대안으로, 부분적으로 변형되는 활액 유도된 조직은 계내에서 형성되어 결함 부위 내로 이식된다.

명세서

기술분야

본 출원은 둘 다 모두 2001년 1월 30일자로 출원된 미국 가출원 연속 번호 제60/263,053호 및 제60/265,064호를 우선권 주장하여 U.S.C. §119(e) 하에 특허청구한 것이다.

본 발명은 연골내 (본 명세서에서 호환 가능하게 사용되는) 결함 또는 병변의 치료 및 수복에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 연골 결함을 충전할 때 사용하기 위한 기질 및 활액 조직 또는 세포를 포함한다. 또한, 형성층 세포도 사용할 수 있다. 또한, 상기 기질 및 활액 조직 또는 세포 제제는 연골 조직의 형성을 유도하는, 활액 세포의 증대와 활액 세

포의 연골세포로의 분화를 각각 용이하게 하는 증식제 및/또는 변형 인자를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 세포가 연골 형성을 촉진하는 연골발생 인자를 표현하도록 연골발생 유전자에 의해 형질감염되는 활액 또는 형성층 세포를 포함한다. 본 발명의 방법은 관절낭 활액 막의 최소한 침입성 생검으로부터 활액 막 조직 또는 세포를 얻는 단계, 적당한 증식 및/또는 변형 인자를 활액 막 조직 또는 세포에 첨가하는 단계 및 구조적 기질을 사용하 거나 사용하는 일 없이 결함 내에 (막 시이트로서 또는 잘게 썬) 조직 또는 세포를 배치하는 단계를 포함한다. 대안으로, 결함은 층상화된 활액 막 시이트에 의해 충전될 수 있다. 활액 막 조직은 결함을 충전하기 전에 부분적으로 제활력화(devitalized)될 수 있다. 대안으로, 결함은 시험관내 또는 계내에서 활액 세포 또는 형성층 세포로부터 제조된 연골세포를 함유하는 기질에 의해 충전될 수 있다. 대안으로, 시험관내 또는 계내에서 형성되는 부분적으로 변형된 활액 유도 조직은 결함을 충족하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 충전된 결함은 피복 막, 바람직하게는 부분적으로 제활력화된 활액 막 시이트를 포함하는 피복 막에 의해 피복될 수 있다. 본 발명의 방법은 골관절염에서, 그리고 다른 질환 및 연골 손상을 생성시키는 외상에서 발견되는 관절 연골 결함의 치료에 특히 유용하다.

미국 특허 제5,206,023호, 제5,270,300호 및 제5,853,746호는 본 명세서에 참고 인용되어 있다.

배경기술

관절은 골격 내의 골들이 연결되어 있는 공통의 경로 중 하나이다. 정상 교접된 골들의 말단은 관절 연골 조직에 의해 피복되어 있는데, 이 관절 연골 조직은 골들이 서로에 대하여 실질적으로 마찰 없이 운동하는 것을 허용한다[L. Weiss, ed., Cell and Tissue Biology(Munchen: Urban and Schwarzenburg, 1988) p. 247].

관절 연골은 특정한 구조적 조직화를 특징으로 한다. 상기 관절 연골은 프로테오글리칸, 우세한 II형의 콜라겐 피브릴, 다른 단백질 및 물이 풍부한 세포내 물질(문헌상 경우에 따라서는 '연골 기질'이라고 칭함) 내에 매립된 특수 세포(연골 세포)로 구성되어 있다[Buckwalter 등, 'Articular Cartilage: Injury and Repair', in Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues(Park Ridge, III., American Academy of Orthopaedic Surgeons Sympsoium, 1987) p. 465]. 상기 연골 기질은 내부에 매립되어 있는 연골세포에 의해 생성되고 유지된다. 연골 조직은 혈관계 및 림프계에 의해 신경 자극받지 않고 또한 침투되지도 않는다. 그러나, 성인의 성숙한 관절에서, 아래에 있는 연골하 골 조직은 골 조직과 연골 사이에 얇은 연속 판을 형성한다. 이러한 연골하 골 조직 또는 골 판은 신경 자극받고 혈관 형성된다. 아래에 있는 이러한 골 판, 골 조직은 골수를 함유하는 소주(trabeculae)를 형성한다. 미숙한 관절에서, 관절 연골은 주요 골 소주에 의해서만이 나타난다. 관절 내의 반월 조직은 또한 그 구성이 관절 연골과 유사한 연골로 구성되어 있다[Beaupre, A. 등, Clin. Orthop. Rel. Res., pp. 72-76(1986)].

2가지 유형의 결함이 관절 표면에서 인지된다. 이들은 전두께 결함 및 표면상 결함이다. 전두께 결함은 연골하 골 판 내로 침투하거나 또는 관통하여 침투하는 결함이고, 표면상 결함은 그렇지 않은 결함이다. 이들 결함은 연골에 대한 물리적 손상의 정도에서 상이할 뿐만 아니라 각 유형의 병변이 유도될 수 있는 수복 반응의 성질에서 상이하다.

관절 표면의 전두께 결함은 유리질 연골, 교접된 연골 층 및 혈관 및 골수를 함유한 연골하 골 조직에 대한 손상을 포함한다. 전두께 결함은 골 판이 감각 신경 말단부를 함유하기 때문에 심한 고통을 야기할 수 있다. 그러한 결함은 일반적으로 심한 외상으로부터 또는 퇴화성 관절 질환, 예컨대 골관절염의 후기 단계 동안 발 생한다. 전두께 결함은 경우에 따라서 출혈 및 연골하 골로부터 수복 반응의 유도를 유발할 수 있다[Buckwalter 등, 'Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair', in Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy(New York: Raven Press, 1990) pp.19-56]. 형성된 수복 조직은 불량한 생체 기계적 특성을 갖고 장 기간 기준으로 지속되지 못하는 혈관형성된 섬유질 유형의 연골이다[Buckwalter 등(1990), 상기 문헌].

관절 연골 조직 내의 표면상 결함은 연골 조직 자체에 제한된다. 그러한 결함은 일반적으로 치료되지 않고 수복 반응의 경향을 전혀 나타내지 않기 때문에 나쁜 것으로 유명하다.

표면상 결함은 연골 표면 내의 갈라진 금, 조각 또는 갈라진 틈으로서 나타날 수 있거나, 또는 침범된 조직 내의 게살 모양의 외형을 가질 수 있다. 표면상 결함은 전두께 결함에서 볼 수 있는 바와 같은 출혈 혈관(혈액 반점)을 전혀 함유하지 않는다. 표면상 결함은 알려진 원인을 전혀 지니고 있지 않을 수 있지만, 경우에 따라 연골 조직의 마모되어 가는 현상을 유발하는 기계적 장애의 결과이다. 기계적 장애는 관절에 가한 외상, 예를 들면 닳아진 반월판 조직의 관절 내로의 이동, 반월판절제술, 닳아진 인대에 의한 관절의 이완, 관절의 치열부정, 뼈 골절에 의해 또는 유전적 질환에 의해 발생할 수 있다. 또한, 표면상 결함은 퇴행성 관절 질환, 예컨대 골관절염의 초기 단계의 특성을 지닌다. 연골 조직이 신경 자극받지 않거나[Ham's History(제9판 개정)(Philadelphia: J.B. Lippincott Co. 1987), pp. 266-272] 또는 혈관 형성되지 않기 때문에, 표면상 결함은 전형적으로 고통스럽지 않다. 그러나, 고통이 없다고 할지라도, 표면상 결함은 일반적으로 치유되지 않고, 경우에 따라서 전두께 결함으로 퇴화된다.

일반적으로 관절 연골이 맥관구조를 결여하고 있기 때문에 손상된 연골 조직은 수복 반응을 유도하는 충분하거나 적당한 자극을 받지 못한 것으로 알려져 있다[Webber 등, 'Intrinsic Repair Capabilities of Rabbit Meniscal Fibrocatilage: A Cell Culture Model', (30th Ann. Orthop. Res. Soc., Atlanta, Feb. 1084); Webber 등, J. Orthop. Res., 3, pp. 36-42(1985)]. 연골성 조직 내의 연골세포는 충분한 양의 수복 자극 제제, 예컨대 성장 인자 및 손상된 혈관 형성 조직 내에 전형적으로 존재하는 피브린 응혈에 정상적으로 반응하지 않는 것으로 이론화되어 있다.

손상된 연골 조직을 수복 자극에 노출시키는 데 사용되는 한가지 접근법은 연골을 관통하여 연골하 골 내로 구멍을 내거나 급경사면을 만들어 출혈을 일으키는 단계를 수반한다[Buckwalter 등(1990), 상기 문헌]. 유감스럽게도, 그러한 외과술 외상에 대한 조직의 수복 반응은 보통 출혈을 일으키는 전두께 결함, 즉 불충분한 생체 기계적 특성을 나타내고 장기간 기준으로 지속되지 않은 섬유질 유형의 연골의 형성에서 자연스럽게 발생하는 관찰된 수복 반응과 비교된다[Buckwalter 등(1990), 상기 문헌].

다양한 성장 인자는 분리되어 왔고, 현재 연구 및 생물의학 용도에 이용 가능하다[예를 들면, 참고 문헌: Rizzino, A., Dev. Biol., 130, pp.411-422(1998)]. 이들 성장 인자 중 일부, 예컨대 변형 성장 인자 베타(TGF-β)는 시험관내 배형성 래트 간엽 세포에서 연골 특이적 분자, 예컨대 II형 콜라겐 및 연골 특이적 프로테오글리칸의 형성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다[예를 들면, 참고 문헌: Seyedin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. Sci. USA, 82, pp. 2267-71`(1985); Seyedin 등, J. Biol. Chem., 261, pp. 5693-95(1986); Seyedin 등, J. Biol. Chem., 262, pp. 1946-1949(1987)].

수백만의 환자들이 골관절염을 갖고 있는 것으로, 즉 관절 연골 내의 퇴화하는 결함 또는 병변을 갖고 있는 것으로 진단 받고 있다. 그런데, 손상된 연골 내의 수복 반응을 유도하는 다양한 방법의 요구에도 불구하고, 이들 치료 중 어느 것도 실질적인 적용에 이용하지 못하고 있다[Buckwalter 등(91990), 상기 문헌; Knutson 등, J. Bone and Joint Surg., 68-B, p. 795(1986); Knutson 등., J. Bone and Joint Surg., 67-B, p.47(1985); Knutson 등, Clin. Orthop., 191, p. 202(1984); Marquet, Clin. Orthop., 146, p. 102(1980)]. 그리고, 그러한 치료는 일반적으로 단지 일시적인 경감만을 제공한다. 또한, '연골보호 제제'의 체계적인 사용도 골관절염의 진행을 저지하고 고통의 경감을 유도할 목적으로 한 것이다[Lohmander, L.S. 등, Ann. Rheum. Dis., 55(7), pp. 424-31(1996)]. 그러나, 그러한 제제는 연골 조직 내의 병변 또는 결함의 수복을 촉진시키지 않는 것으로 나타났다.

고려되고 있는 한가지 접근법이 미국 특허 제4,846,835호에 예시되어 있다. 여기서, 연골세포는 생검에 의해 제거된 성숙한 연골 조직으로부터 채취하고, 이어서 조직 배양액에서 수회 성장 또는 증대시킨 후, 연골세포를 계내에 고정하기 위 해 사용된 콜라겐 겔 기질 내의 결함 부위 내로 이식한다. 골막 시이트는 결함 내의 이식된 세포(즉, 그라프트)를 고정하는 데 사용된다. 이러한 접근법은 본 발명보다 더 침습적인 단점 및 성숙한 연골을 제거함으로써 추가의 연골 결함을 형성하는 단점을 겪고 있다. 또한, 결함을 수복하기 위해서 관절 연골세포를 사용하는 것도 관절 연골세포가 활액 세포와 비교했을 때 보다 제한된 증식 가능성을 갖고 있기 때문에 불리한 단점이 된다.

또 다른 접근법은 연골 결함 내로 이식시키기 위해서 시험관내에서 골수 유도된 간엽 줄기 세포를 변형시켜 연골세포를 형성시키는 데 이용되고 있다[Caplan 및 Haynesworth, 미국 특허 제5,811,094호]. 이 세포는 단지 골수 생검으로부터만 얻을 수 있으며, 환자의 도너 부위(보통 골반의 장골 융기부)에서의 장시간 국부 병리상태와 관련이 있을 수 있다. 이어서, 생검 처리된 골수 세포는 정교한 기법을 이용하여 정제하고, 시험관내에서 증대시키며, 결함 부위에 시딩해야 한다[참고 문헌: Caplan 등, Clin. Orthop., 342, pp. 254-269(1997)].

문헌상에 발견되는 또 다른 접근법은 새로운 조직의 성장을 자극하기 위해서 결함의 주위 조직을 관통하게 전압을 가하는 것이다[미국 특허 제4,506,673호].

그러한 결함을 수복하는 또 다른 접근법은 미국 특허 제5,270,300호, 제5,206,023호 및 제4,506,858호에서 발견되는데, 이들 특허에서 발명자들은 수복 세포가 활액 구획 내지 결함 부위에 부착되어 있는 발명을 설명하고 있으며, 그러한 구획 내지 부위에서 수복 세포는 새로운 연골 기질을 합성하는 연골세포로 증식 및 분화되는 것을 유도한다.

관절 연골 결함 내에 있는 현탁 상태의 세포 또는 기질을 보유하는 한가지 수단은 결함 공간의 상부에 적당한 엷은 피복 막을 봉합 처리하는 것이다. 현재까지 사용된 피복 막 물질은 골막 유도된 근막, 연골막 유도된 근막 및 근육 근막이어 왔다. 이들 피복 막 또는 다른 인공 피복 막은 피복 막 자체가 연골 조직으로 변형되지 않거나, 또는 단지 제한된 정도로 변형된다는 유의적인 단점을 갖는다. 따라서, 결함 공간은 수복 연골로 완전히 충전되지 않는다. 게다가, 섬유질 유형의 피복 막의 분해는 매우 느리다. 또한, 이들 피복 막은 결함 병변 경계를 따라 천연 조직과 통합되지 않는다. 그러한 피복 막 조직은 연골세포로 변형되지 않지만 대신 바람직하지 못한 자국 같은 조직을 형성하는 섬유아세포를 함유할 수 있다. 따라서, 피복 막에 관한 선행 기술에서, 섬유아세포는 수복 공간 내로 또는 밖으로 이동하고, 그 수복 공간을 오염시키며, 원하지 않는 자국 조직 형성을 유발할 수 있다.

그러므로, 예를 들면 심각한 기계적 손상 및 골관절염의 경우에 발견되는 바와 같은 표면상 연골 결함 및 전두께 연골

결함에 대한 간단하고 신속하며 신뢰성이 있는 치료가 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명은 사람 및 기타 동물의 연골 병변의 수복을 유발하는 데 효과적인 치료 조성물 및 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하면, 관절의 가능한 절제와, 금속 및/또는 플라스틱 인공 관절로의 치환을 유도하고 달리 유효 관절 기능의 손실을 유발하는 골관절염의 외상 병변 및 형태의 치유를 촉진한다.

본 발명에서, 관절 내 연골 결함을 가진 환자의 관절 부위에 국소 마취제를 투여하거나, 또는 전신 마취제를 투여할 수 있다. 적당한 외과술 도구를 사용하여 활액 막 조직의 부분을 추출한다. 활액 조직을 결함으로서 동일 관절로부터 취하는 것이 유리할 수 있는데, 그 이유는 연골과 활액 조직이 이들이 유도되는 특정 관절을 대표하는 기계적 특성 및 구조적 특성을 충족시키는 형태로 성숙하기 때문이다[Kuettner, K.E., Clin. Biochem., 25, pp. 155-63 (1992)(상이한 관절의 연골은 생화학적으로 상이하다); Archer, C.W., Ann. Rheum. Dis., 53, pp. 624-30 (1994)(태아 연골은 관절마다 다르다)]. 그러나, 일부 경우에서, 불충분한 양의 도너 활액 조직을 함유하는 소관절의 수복에 사용하기 위해 대관절로부터 활액 조직을 취하는 것이 바람직할 수 있다. 이와 같이 획득된 활액 막 조직 또는 세포는 후술되는 바와 같은 수복 절차에 사용된다. 대안으로, 골막 또는 연골막으로부터 유래한 형성층은 세포 또는 수복 조직의 공급원으로서 사용될 수 있다.

수복 물질로 결함을 충전하기 전에, 결함 부위에서의 관절 연골의 에지를 프로테오글리칸 분해 효소로 처리하여 표면상의 프로테오글리칸을 제거하는 것이 바람직하다. 이 처리는 아래에 있는 콜라겐 망상체를 노출시켜서 보다 큰 조직 통합 및 수복 물질의 유착을 허용한다.

본 발명의 한 가지 실시양태에서, 활액 막 조직은 즉각적 이식 절차(immediate replantation procedure)에 사용한다. 활액 막 또는 잘게 썬 활액 막은 활액 세포의 연골세포로의 분화를 유도하여 새로운 연골을 형성함으로써 결함을 수복하는 변형 인자의 존재 하에 이식하는 것이 바람직하다. 활액 막 또는 잘게 썬 활액 막은 생분해성 기질에 분배한 다음, 결함 부위로 이식하는 것이 바람직하다. 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템에 의해 투여할 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시양태에서, 잘게 썬 활액 막은 간단한 콜라게나제 분해 및 트립신 분해(30 분 내지 45 분)로 처리한 후, 수술실에서 신속한 정제를 수행한다. 그 다음, 이러한 활액 비트를 결함 부위에 즉각적 이식하는 데 사용하고, 이식 후 이들이 연골세포로 분화되도록 하는 변형 인자를 포함하는 생분해성 기질에 현탁시킨다. 대안으로, 스택으로 배열된 활액 막 시이트는 결함을 충전하는 데 사용할 수 있다. 적당한 변형 인자의 첨가는 계내에서 연골세포로의 활액 세포의 변형을 촉진시킨다. 이러한 인자는 활액 막 시이트 사이에 배치하는 것이 바람직하다. 또한, 적당한 항혈관형성제를 사용하여 새로운 연골 조직의 혈관형성을 방지할 수 있으며, 적당한 광화/석회화 억제제를 사용하여 새로운 연골 조직의 골화(ossification)를 방지할 수 있다.

대안으로, 전체 골막, 연골막 또는 바람직하게는 골막 또는 연골막의 형성층 시이트를 사용하여 결함을 충전한다. 조직의 몇 가지 형태, 즉 비트, 시이트, 비트로 산재된 시이트, 생분해성 기질에 현탁된 조직 또는 이들 요소의 조합 중 어느 것이라도 가능하다. 또한, 상이한 조직들을 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들면, 골막 형성층 시이트는 결함 바닥에 배치할 수 있으며, 활액 또는 골막 비트를 함유하는 생분해성 기질을 사용하여 결함을 충전하고, 활액 막 시이트를 사용하여 결함 을 피복할 수 있다. 대안으로, 활액 막 시이트와 골막 또는 연골막 시이트와의 혼합층을 사용하여 결함을 충전할 수 있다.

또한, 활액 세포를 이식 절차(implantation procedure)에 사용할 수 있다. 활액 세포를 활액 막 또는 유체로부터 얻거나, 또는 대안으로 형성층 세포를 골막 또는 연골막의 형성층으로부터 얻는다. 세포의 수가 충분하지 않은 경우(후술되는 바와 같음), 세포를 배양하고, 시험관내에서 증대시킨다. 배양된 세포가 충분한 수로 늘어나면, 이들을 연골 결함 부위에 이식한다. 세포는 결함 부위로 이식되는 생분해성 기질 내에 이식하는 것이 바람직하다. 세포는 활액 세포의 연골세포로의 분화를 유발하여 새로운 연골을 형성함으로써 결함을 수복시키는 변형 인자의 존재 하에 이식한다. 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템에 의해 투여할 수 있다.

대안으로, 연골세포를 변형된 활액 막 시이트로부터 분리한 다음, 이들을 기질로 삽입함으로써 또는 전술한 바와 같이 현탁시킴으로써 결함 공간에 이식할 수 있다. 또한, 이러한 방식으로 유도된 연골세포는 그 수를 증가시키고, 연골발생 아집단에 대해 선택하기 위하여 이식 전에 시험관 내에서 증대시킬 수도 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 활액 세포는 시험관내에서 변형 인자의 존재 하에 연골세포로 분화되도록 유도되어 연골 조직을 형성하기 시작한다. 세포주위 기질의 부분 효소 분해를 수행하여 개별 연골세포를 방출한 다음, 덩어리로서

결함 부위에 이식한다. 대안으로, 시험관 내에서 형성된 연골 조직을 생분해성 기질에 이식한 다음, 결함 부위에 이식할 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 활액 세포는 연골세포로 계내 변형될 수 있 다. 본 발명의 이러한 양태에서, 활액 세포는 활액 함요 중 하나 또는 지방 패드에 근접하여 활액 막에 봉합된 분화 인자 포화 기질 패드를 사용함으로써 계내 분화되도록 유도된다. 대안으로, 이것은 관절 공간의 바로 외부의 활액 조직에 분화 인자 포화 기질 패드를 부착시킴으로써 달성될 수 있으므로, 관절 개방의 필요성이 제거된다. 변형된 조직을 절제하고, 약 30 내지 45 분 동안 콜라게나제 및 트립신 분해를 이용하여 세포를 신속하게 분리한다. 새로 변형된 연골세포를 계내 이식 전에 시험관 내에서 더 증대시키고 및/또는 분화시킬 수 있다. 그 다음, 연골세포는 현탁액(관절 공동으로의 세포 손실을 방지하기 위해 막을 피복함으로써 피복됨) 또는 기질 내 결함 부위에 이식하여 세포를 결함 공간에 유지시킬 수 있다. 피복 막은 병변의 상부 주변에 인접한 결함 에지에 봉합할 수 있다.

각각의 상기 실시양태에서, 이 조직은 조직 또는 세포가 결함 부위에서 손실되는 것을 방지하고, 결함 공간을 효과적으로 충전하기 위하여 생분해성 기질 내에 이식하고, 임의의 제제 또는 인자를 위한 담체로서 사용하여 결함을 치료하는 것이 바람직하다. 대안으로, 또는 추가로, 이식 후 결함 부위의 표면은 조직 또는 세포가 결함 부위에서 손실되는 것을 방지하기 위하여 생분해성 박막('피복 막')에 의해 피복하는 것이 바람직하다.

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 활액 피복 막, 바람직하게는 부분 제활력화(즉, 대식세포가 부분적으로 고갈됨) 또는 완전 천연인 활액 피복 막을 사용하여 충전된 결함을 피복할 수 있다. 대안으로, 3회의 냉동 해동 주기를 통하여 완전 제활력화될 수 있는(아래에 있는 수복 기질 내 성장 인자에 노출시킨 후 오염 세포 과성장을 방지하기 위하여) 근막 조직 시이트를 사용하여 결함을 피복할 수 있다. 대안으로, 생분해성 막은 인공(예컨대, 폴리락트산 시이트, 히알루론산 시이트 및 얇은(미세) 콜라겐 메쉬) 또는 천연(예컨대, 골막, 연골막)일 수 잇다. 천연 골막 또는 연골막 피복 막은 본 발명에 따라 성장 인자를 사용하는 경우에 바람직하지 않은데, 그 이유는 그러한 인자가 이들 피복 막 내 세포를 자극하여 결함 부위를 오염시킬 수 있기 때문이다. 그러나, 이는 형성층 단독을 사용한 경우에 대체로 중요하지 않다.

관절 연골 결함을 피복하기 위한 피복 막으로서 활액 조직 막을 사용하는 것은 골막 조직 또는 근막을 포함하는 종래 기술의 피복 막에 비하여 이점을 가진다. 활액 조직은 연골세포와 연골로 보다 완전하게 변형될 수 있으며, 바람직하게는 인접 연골 조직으로 통합될 수 있다. 통상적으로, 연골 조직과 근막은 모두 연골세포 및 연골로 변형될 수 없는 많은 섬유아세포를 함유할 수 있고, 자국 조직으로서 잔존한다. 연골세포 및 연골로의 변형에 의하여 활액 조직 막은 이들 아래의 결함에 추가 치료 제제 없이 얕은 결함을 수복하는 데 적당할 수 있다.

피복 막으로서 활액 조직을 사용하는 경우, 조직을 변형 인자로 처리하는 것이 바람직하다. 또한, 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템과 관련하여 사용하는 것이 바람직하다. 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템이 있건 없건 활액 피복 막에 첨가하거나, 또는 활액 피복 막은 방출 제어형 전달 시스템이 있건 없건 변형 인자의 용액에 침지할 수 있다.

본 발명은 종래 기술의 절차보다 더 간편하고 신속한 절차이다. 예를 들면, 본 발명은 수복 세포의 결함 부위로의 이동을 유도하기 위해 유인성 인자의 존재를 요하지 않으며, 골수 유도 간엽 세포를 사용하는 데 필요한 복잡한 추출 및 정제 절차를 요하지 않는다.

무릎에서, 활액 조직은 슬개골후 지방 패드 근방의 함요로부터 또는 슬개골상 함요 내에서 절제될 수 있는데, 여기에 대량의 활액 조직 비축분이 존재한다. 활액 조직의 그러한 제거는 관절 기능의 손상을 실질적으로 전혀 수반하지 않는다. 활액 막의 패드를 제거하는 것은 임의의 관절 병리학과 관련이 없으며, 이러한 조직 내 임의의 병변은 자발적으로 치유되는 경향이 있다.

또한, 충전된 결함을 피복하기 위한 본 발명의 활액 조직 피복 막의 사용은 전체 피복 막 자체가 연골 조직으로 변형되고, 새로 형성된 수복 연골로 통합될 수 있다는 점에서 종래 기술의 방법에 비하여 상당한 이점을 가진다. 더욱이, 이것은 골과 같은 인접하는 천연 조직과 잘 통합될 수 있다. 또한, 변형 성장 인자를 사용하는 경우, 활액 조직 피복 막이 주로 연골발생 전구체 세포를 함유하기 때문에 유리하다.

또한, 본 발명에 따른 부분 제활력화된 조직 피복 막을 사용하는 것도 유리하다. 대안으로, 근막 피복 막을 사용할 수 있다. 그러한 근막 피복 막은 섬유아세포, 대식 세포 및 다른 세포 유형이 새로 형성된 연골 조직을 오염시키고, 이어서 바람직하지 않은 자국 조직을 형성하는 것을 방지하기 위하여 사용하기 전에 완전히 제활력화시킨다(즉, 사용전에 3회 냉동 및 해동된다).

활액 피복 막의 경우, 부분 제활력화가 대식세포를 선택적으로 제거하고, 다 른 세포 유형은 제거하지 않는 것이 바람직하다. 이것은 단일 냉동-해동 주기, 또는 대식 세포 및 다른 염증성 세포의 선택적 제거를 위한 분야에 기술 공지된 다른 수단에 의해 달성된다(예컨대, 대식 세포는 항대식 세포 항체 또는 대식 세포를 선택적으로 중화시키는 다른 물

질에 의해 활액 또는 다른 조직으로부터 제거될 수 있다).

각각의 상기 실시양태에서, 항염증제를 국소적으로 사용하여 대식 세포 이동, 활성화 및 증식, 뿐만 아니라 판누스 형성을 방지할 수 있다. 항염증제로는 스테로이드계 약물, 예컨대 프레드니손 및 비스테로이드계 약물('NSAID'), 예컨대 이부프로펜, 케토프로펜, 피록시캄, 나프록센, 술린닥, 아스피린, 콜린 서브살리실레이트, 디플루니살, 페노프로펜, 인도메타신, 메클로페나메이트, 살살레이트, 톨메틴 및 살리실산마그네슘이 있다. 이러한 항염증제는 활액 또는 세포를 함유하는 기질내 방출 제어형 전달 시스템 내의 결함에 투여될 수 있거나, 또는 층상화된 활액막 시이트들 사이에 배치될 수 있다 . 전달 시스템의 예로는 폴리(락트)산(PLA), 폴리(D,L-락트-코-글리콜)산(PLGA) 또는 폴리(엡실론-카프로락톤)(PCL) 마이크로구, 리포솜, 생체침식성 중합체, 헤파린 술페이트 프로테오글리칸에 화학적으로 연결된 콜라겐 섬유 및 탄수화물계 소체가 있다.

각각의 상기 실시양태에서, 연골 수복은 활액 조직 또는 세포의 자가 이식에 의하여, 즉 동일 개체로부터 수행될 수 있거나, 또는 대안으로 활액 조직 또는 세포의 이종 이식을 수행할 수 있다. 이종 이식은 당업계에 공지된 면역 억제 요법의 동시 투여를 요할 수 있다.

또한, 본 발명의 활액 조직 피복 막은, 한정하는 것은 아니지만 미국 특허 제5,206,023호, 제5,270,300호 및 제5,853,746호에 기재된 것들을 비롯하여 당업계에 공지된 다른 연골 수복 기법과 함께 사용될 수도 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명을 보다 완전히 이해하기 위하여, 하기 상세한 설명을 제공한다. 상세한 설명에서는, 다음과 같은 용어를 사용한다.

항혈관형성제(ant-angiogenic anget) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 아래에 있는 골 조직에서의 연골 조직으로의 혈관의 내방성장을 방지하는 생물학적 활성을 가진 임의의 화합물 또는 조성물을 의미하며, 예컨대 항침습성 인자, 연골 유도 혈관형성 억제제, 안지오스타틴, 메탈로프로테아제 억제제, 혈관형성 유도 인자(예컨대, bFGF 및 내피세포 자극 혈관형성 인자(ESAF))에 대한 항체, 수라민(Germanin(등록 상표, 바이어 AG, 독일 소재), 푸마길린, 푸마길린 유사체 및 AGM-1470이 있다[Peacock, D.J. 등, *Cellular Immunology* , **160** , pp. 178-84 (1995)]. 항혈관형성제를 측정하기 위한 생체내 및 시험관내 분석은 당업계에 널리 알려져 있다[예컨대, Moses, M.A., *Clinical amp; Exptl. Rheumatology* , **11(Suppl. 8)** , pp. 567-69 (1993); Moses, M.A. 등, *J. Cell Bio.* , **119(2)** , pp. 475-82 (1992); Moses, M.A. 등, *Science* , **248** , pp. 1408-10 (1990); Ingber, D. 등, *Nature* , **348(6)** , pp. 555-57 (1990)].

관절 촬영 내시경 검사법(Arthroscopy)) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 관절을 검사하거나 관절 외과술을 수행하기 위한 관절 촬영 내시경의 사용을 의미한다.

형성층 세포(Cambium Cell) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 관절과 골의 연골막 및 골막의 형성층에서 발견되는 세포를 의미한다.

연골(Cartilage) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 콜라겐(다른 소수 유형, 예컨대 IX형 및 XI형과 함께 주로 II형 콜라겐)의 피브릴, 다양한 프로테오글리칸(예컨대, 콘드로이틴술페이트 프로테오글리칸, 케라탄술페이트 프로테오글리칸 및 더마탄술페이트 프로테오글리칸), 다른 단백질 및 물을 포함하는 세포간 물질(흔히 '연골 기질'라고 함)에 매립된 연골세포를 함유하는 결합 조직의 유형을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 연골은 관절 연골 및 반월 연골을 포함한다. 관절 연골은 관절 내 골 부분의 표면을 피복하고, 직접적인 골 대 골 접촉 없이 관절 운동을 허용함으로써 나란히 놓인 골 표면에 대한 마모와 손상을 방지한다. 또한, 대부분의 정상적으로 건강한 관절 연골은 특징적인 무광택 유리 외관을 가진 '유리질(hyaline)'로도 기술된다. 보통, 반월 연골은 진동뿐만 아니라 운동에 노출되는 관절에서 발견된다. 반월 연골의 그러한 위치로는 측두하악골 관절, 흉쇄 관절, 견봉쇄골 관절, 수근관절 및 슬관절이 있다[*Gray's Anatomy* (New York: Bounty Books, 1977)].

세포 유착 촉진 인자(Cell Adhension Promotional Factor) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 세포외 물질에 대한 세포의 유착을 매개하는 트리펩티드 Arg-Gly-Asp를 포함하는, 피브로넥틴 및 테트라펩티드 정도로 작은 다른 펩티드를 비롯한 임의의 화합물 또는 조성물을 의미한다[Ruoslathi 등, *Cell* , **44** , pp. 517-518 (1986)].

연골세포(Chondrocytes) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 연골 조직의 성분, 예컨대 II형 연골성 피브릴 및 섬유 및 프로테오글리칸을 생성할 수 있는 세포를 의미한다.

피복 막(covering membrane) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 인접하는 공간으로 세포가 손실되는 것을 방지하기 위하여 이식 후 충전된 결함 부위를 피복하는 데 사용될 수 있는 임의의 물질, 뿐만 아니라 골 결함 부분과 전두께 결함의 연골 결함 부분 사이에에 배치할 수 있으며, 골 결함 부분으로부터 전두께 결함의 연골 결함으로의 세포 이

동 및 혈관 침윤을 방지하는 임의의 물질을 의미한다. 본 발명의 방법과 조성물에 사용되는 막은 생분해성인 것이 바람직하고, 활액 막, 폴리락트산 시이트, 히알루론산 시이트, 얇은(미세) 콜라겐 메쉬, 골막, 연골막 또는 근막을 포함할 수 있다. 전형적으로, 활액 막은 연골 조직으로 변형되어 수복 연골 조직으로 통합된다. 비생분해성 막으로는 테플론(Goretex(등록 상표)) 막, Millipore(등록 상표) 막 또는 Verigen(등록 상표) 막을 포함할 수 있다.

섬유아세포 성장 인자(FGF: fibroblast growth factor) - 천연, 합성, 재조합 공급원으로부터 얻어진 FGF 폴리펩티드 부류의 임의의 구성원[Gimenez-Gallego 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **135** , pp. 541-548 (1986); Thomas 등, *Trends Biochem. Sci.* , **11** , pp. 81-84 (1996)] 또는 이들의 유도체로서, 1차 섬유아세포, 연골세포, 혈관 및 각막 내피 세포, 골아세포, 근아세포, 평활근 및 신경교세포를 비롯한 다양한 세포의 시험관내 DNA 합성 및 세포 분할[분석에 대해서는, 예컨대 Gimenez-Gallego 등, 1986, 상기 참조; Canalis 등, *J. Clin. Invest.* , **81** , pp. 1572-1577 (1988)]을 자극할 수 있는 능력을 나타낸다[Thomas 등, 1986, 상기 참조]. FGF는 그 등전점(pI)에 따라서 산성(aFGF) FGF 또는 염기성(bFGF) FGF으로 분류할 수 있다.

기질(matrix) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 세포가 물질 내에 집단화할 수 있기에 충분히 큰 세공 또는 공간을 가진 고체 또는 반고체 물질인 다공성 복합체를 의미한다. 용어 기질은 기질 형성 물질, 즉 연골 또는 골의 결함 부위 내에서 기질을 형성할 수 있는 물질을 포함한다. 기질 형성 물질은 기질을 형성하기 위하여 중합제를 첨가하는 것, 예컨대 피브린 기질을 형성하기 위하여 피브리노겐을 함유하는 용액에 트롬빈을 첨가하는 것이 요구될 수 있다. 다른 기질 물질로는 콜라겐, 콜라겐과 피브린의 조합, 아가로즈예컨대, Sepharose(등록 상표)), 젤라틴, 히알루론산(히알루로난), 콜라겐과 조합한 히알루론산, 광중합성 기질, 알부민계 기질, 폴리락트산계 기질, 폴리글리콜산계 기질 및 피브린계 기질이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 인산칼슘, 예컨대 인산삼칼슘, 히드록시아파타이트 또는 고형 기질을 형성하는 다른 칼슘염을 단독으로 또는 다른 기질 물질과 조합하여 골의 결함을 치료하는 데 사용할 수 있다.

증식(미토겐)제(Proliferation (mitogenic) agent) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 시험관내 세포의 증식을 자극할 수 있는, 펩티드, 단백질 및 당단백질을 비롯한 임의의 화합물 또는 조성물을 의미한다. 펩티드, 폴리펩티드 및 다른 화합물의 증식(미토겐) 활성을 측정하기 위한 시험관내 분석은 당업계에 널리 알려 져 있다[예컨대, Canalis 등, 1988, 상기 참조; Gimenez-Gallego 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **135** , pp. 541-548 (1986); Rizzino, 'Soft Agar Growth Assays for Transforming Growth Factors and Mitogenic Peptides', in *Methods Enzymol.* , **146A** (New York: Academic Press, 1987), pp. 341-52; Dickson 등, 'Assay of Mitogen-Induced Effects on Cellular Incorporation of Precursors for Scavengers, *de novo* , and Net DNA Synthesis', in *Methods Enzymol.* , **146A** (New York: Academic Press, 1987), pp. 329-40]. 화합물 또는 조성물의 증식(미토겐) 활성을 측정하는 한 가지 표준 방법은 연질 한천 중에서 비변형된 세포의 고정-비의존성 성장을 유발하는 능력에 대해 그것을 시험관내 분석하는 것이다[예컨대, Rizzino, 1987, 상기 참조]. 다른 미토겐 활성 분석 시스템도 공지되어 있다[예컨대, Gimenez-Gallego 등, 1986, 상기 참조; Canalis 등, 1988, 상기 참조; Dickson 등, 1987, 상기 참조]. 제제의 미토겐 활성은 흔히 매우 농도 의존성이며, 그 제제의 효과는 미토겐 효능에 대한 최적 농도 범위보다 더 낮거나 더 높은 농도에서 역전될 수 있다.

활액 세포(synovial cell) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 활액 막과 생리학적으로 관련있거나 활액하 공간에 존재하는 세포, 즉 관절 활액 막 또는 활액 유체로부터 얻어지는 세포를 의미한다. 적당한 자극에 노출되는 경우, 활액 세포는 분화되고, 연골세포로 변형될 것이다. 활액 유도 수복 세포로는 간엽 세포, 섬유아세포, 섬유아세포 유사 세포, 대식 세포, 탈분화 연골세포, 활액 내막 세포 및 활액 섬유아세포 유사 세포가 있다.

변형 인자(transforming factor) - 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 예컨대 활액 유도 세포의 연골세포로의 분화를 유도하는 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 임의의 다른 화합물 또는 조성물을 의미한다. 또한, 이것은 결함 수복에 사용되는 세포로 (예컨대, 형질감염에 의해) 유도되는 유전자의 생성물을 포함한다. 세포에 의한 연골 특이적인 프로테오글리칸 및 II형 콜라겐의 생성을 유도 또는 자극할 수 있는 화합물 또는 조성물의 능력은 당업계에 공지된 시험관내 분석에 의해 측정할 수 있다[Seyedin 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **82** , pp. 2267-71 (1985); Seyedin 등, *Path. Immunol. Res.* , **7** , pp. 38-42 (1987)].

변형 성장 인자 베타(TGF-β) - 천연, 합성, 재조합 공급원으로부터 얻어진 TGF-β 폴리펩티드 부류의 임의의 구성원[Derynck, R. 등, *Nauter* , **316** , pp. 701-705 (1985); Roberts 등, 'The transforming growth factor-β's', In *Peptide growth factors and their receptors I* (Berlin: Springer Verlag, 1990), p. 419)] 또는 이들의 유도체로서, 정상 래트 신장(NRK) 세포를 자극하여 연질 한천 분석에서 성장시키고 군체를 형성할 수 있는 특징적인 TGF-β 능력을 나타내고[Roberts 등, 'Purification of Type β Transforming Growth Factors From Non-neoplastic Tissues', in *Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum-Free animal Cell Culture* (New York: Alan R. Liss, Inc., 1984)], 시험관내 세포에 의한 연골 특이적인 프로테오글리칸 및 II형 콜라겐의 생성을 유도 또는 자극하는 능력으로 입증된 바와 같이, 연골세포로의 활액 유도 수복 세포의 변형을 유도할 수 있다[Seyedin 등, 1985, 상기 참조].

<u>결함의 준비와 활액 조직의 획득</u>

본 발명에 따라 연골의 결함 및 병변을 치료하는 방법을 수행하기 위해, 수복하려는 관절 연골 결함을 우선 확인한다. 동물에서 연골 결함은 관절의 관절 찰영 내시경 조사 또는 절개 외과술 중 병변 또는 결함의 단순 조사중 동안 시각적으로 용이하게 확인할 수 있다. 또한, 연골 결함은 컴퓨터 연결된 토모그래피(CAT 스캐닝), X-선 조사, 자기 공명 영상화(MRI), 활액 또는 혈청 마커의 분석, 또는 당업계에 공지된 다른 절차를 이용하여 추측 확인할 수 있다.

일단 결함이 확인되면, 수복전 또는 수복시에 외과의는 그 결함을 외과적으로 변경시켜 본원에 기술된 치료 방법에 첨가됨 활액 막 조직, 세포 및/또는 기질 물질을 물리적으로 보유할 수 있는 능력을 강화시키도록 선택할 수 있다. 바람직하게는, 편평하거나 얇은 오목 기하구조를 보유하는 대신에, 상기 결함은 본원에 기술된 치료 방법에 첨가된 활액 막 조직, 세포 및/또는 기질 물질을 더 잘 보유하기 위해 수직 에지를 보유하거나, 그와 같은 에지를 갖도록 성형하거나 하부를 절단한다. 전두께 결함 및 얇은 결함 둘 다는 연골하 골판내에 측정된 천공을 만드는 단계를 포함하는 '마이크로골절(microfracture)'이라 칭하는 과정에서 불연속 출혈 부위를 생성하도록 처치할 수 있다. 방출될 골수 요소들은 신생 조직 형성을 위해 강화된 환경을 제공하는 외과적으로 유도된 응괴를 형성한다[참조: Steadman 등, Clin. Orthop., 391 Suppl., pp. S362-69 (2001. 10)].

한 실시양태에서, 국부 마취하에 작은 관절 찰영 내시경 또는 외과적 개입을 수행한다. 결함 부위는 필요에 따라 프로테오글리칸 분해 효소 또는 이식된 활액 막 조직, 세포 또는 기질의 유착을 촉진시키는 다른 물질을 사용하여 이식 이전에 처리할 수도 있다. 상기 결함의 표면은 멸균 흡수성 조직을 이용하여 상기 부위를 블로팅함으로써 건조하고, 상기 결함 용적은 2 분 내지 10 분의 기간 동안 멸균 효소 용액으로 충전하여 연골의 표면 및 국소적으로 상기 결함의 표면으부터 깊이 약 1 내지 2 ㎛에 존재하는 프로테오글리칸을 분해시킨다. 멸균 완충 수용액내에 여러가지 효소들을 단독 사용하거나 병용하여 프로테오글리칸을 분해시킬 수 있다. 상기 용액의 pH는 최대 효소 활성이 발현되도록 최적화시켜야만 한다.

본 발명의 방법에서 프로테오글리칸을 분해하기에 유용한 효소로는 콘드로이티나제 ABC, 콘드로이티나제 AC, 하이알루로니다제, 펩신, 트립신, 키모트립신, 파파인, 프로나제, 스트로멜리신 및 스타프 V8 프로테아제를 들 수 있다[참조: Jurgensen, K. 등, J. Bone Joint Surg. Am., 79(2), pp. 185-93 (1997); Hunziker, E.B. 등, J. Bone Joint Surg. Br., 80(1), pp. 144-50 (1998)]. 특정 효소 또는 효소 배합물의 농도는 효소 용액의 활성에 따라 달라질 것이다.

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 결함은 1 U/ml 농도의 콘드로이티나제 AC의 멸균 용액으로 충전시키고, 분해는 4 분 동안 수행한다. 콘트로이티나제 AC의 바람직한 농도는 실시예 1에 기술된 절차에 따라 결정된다. 사용된 임의의 다른 효소는 깊이 약 1 내지 2 ㎛ 까지만 표면 프로테오글리칸이 분해되도록 일정 농도로 그리고 일정 시간 동안 사용하여야만 한다.

효소 용액을 적용하는 시간은 프로테오글리칸의 분해가 주로 수복 부위에서 일어나도록 하기 위해 최소로 유지되어야만 한다. 콘드로이티나제 ABC 또는 AC를 1 U/ml의 농도로 사용하는 경우, 10분 보다 긴 분해 시간은 결함 부위 외부의 프로테오글리칸을 분해할 수 있는데, 이러한 분해는 불필요한 것이며, 잠재적으로 해로울 수 있다. 또한, 10분 보다 긴 분해 시간은 상기 절차의 전체적인 시간에 비해 너무 긴 시간이다. 상기 절차의 전체적인 수행 시간은 특히 관절 절개술의 시술중에는 최소로 유지되어야만 하는데, 그 이유는 공기 노출에 의해 연골이 손상될 수 있기 때문이다[참조: Mitchell 등, (1989) 상기 문헌 참조]. 이러한 이유로 인해, 효소 분해를 이용하여 프로테오글리칸을 분해하는 단계를 포함하는 본 발명의 실시양태에서, 분해 시간은 10분 미만이 바람직하며, 5분 미만의 분해 시간이 가장 바람직하다.

본 발명의 방법에 따라, 상기 효소가 결함의 표면으로부터 프로테오글리칸을 분해한 후, 상기 효소 용액은 결함 부위로부터 제거해야만 한다. 상기 효소 용액의 제거는 미세 흡입 팁이 장착된 흡입기를 사용하여 수행한 다음, 면 재질의 스폰지로 닦아냄으로써 수행한다. 대안으로, 상기 효소 용액은 면 재질의 스폰지로 닦아내는 것만으로 제거할 수도 있다.

상기 효소 용액의 제거후, 상기 결함은 멸균 생리 염수(예를 들어, 0.15 M NaCl)을 이용하여 완전히, 바람직하게는 3회 세정하여야만 한다. 이어서, 세정된 결함 부위는 건조해야만 한다. 멸균 거즈 또는 면 재질을 이용하여 결함 부위를 건조시킬 수 있다.

수술중의 활액 막 이식(replantation 또는 implantation)에서, 프로테오글리칸 분해 효소는 완전히 세척하여 임의의 프로테아제를 제거함으로써 첨가된 성장 인자의 불활성화를 예방하여야 한다.

대안으로, 또는 효소 처리 단계 이외에도, 상기 결함 부위는 피브린 글루 또는 트랜스글루타미나제와 같은 화합물을 이용하여 드레싱함으로써 결함 부위에 대한 기질의 유착을 강화시킬 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 피브린 글루 또는 트랜스글루타미나제는, 결함 부위를 효소 처리하고 세정하며, 건조한 후에, 상기 결함 부위에 적용한다. 피브린 글루는 기질의 피브릴과 결함 표면 상의 연골 콜라겐 피브릴의 화학 결합(가교 결합)을 촉진시킨다[참조: Gibble 등, Transfusion, 30(8), pp. 741-47 (1990)]. 상기한 효소 트랜스글루타미나제를 사용하여 동일한 효과를 얻을 수 있다

[참조: 예를 들어, Ichinose 등, J. Biol. Chem., 256(23), pp. 13411-14 (1990); 'Transglutaminase,' Eds: V. A. Najjar 및 L. Lorand, Martinus Nijhoff Publishers(Boston, 1984)]. 또한, 봉합, 소작요법(cauterization) 또는 피브린 글루 또는 트랜스글루타미나제 이외의 세포외 물질의 유착을 촉진시킬 수 있는 다른 물질을 사용할 수도 있다.

상기한 바와 같은 결함이 있는 환자는 상기 결함을 보유하는 관절을 국부 마취하거나, 전신 마취를 수행하고, 적합한 외과적 도구(예를 들어, 생검 세트, 스칼펠 또는 관절 찰영 내시경)을 사용하여 적합한 양의 활액 막 및/또는 활액 유체를 관절로부터 추출한다. 무릎 관절에서, 활액 막 물질은 무릎 관절내 또는 슬개골상 함요내의 지방 패드 근처 또는 지방 패드로부터 떨어진 함요로부터 제거하는 것이 바람직하다. 또한, 지방 패드 조직을 포함하는 활액 막 조직은, 추가의 조직 벌크가 상기 결함을 완전히 충전하기에 유용한 경우, 사용할 수 있다. 일반적으로, 활 액 막은 반대로 겹쳐져 위치하고 관절 연골 표면과 직접 마주하지 않는 부위로부터 제거되어야만 한다.

활액 막 조직의 용도

획득한 활액 막 조직은 신속한 수술중 활액 막 이식 절차에 이용할 수 있다. 활액 막 조직은 필요에 따라 1회의 동결-해동 주기를 이용하여 제활력화시킨 다음 상기 결함 내에 배치할 수 있다. 증식제 및/또는 변형 인자를 함유하는 기질은 필요에 따라 상기 결함을 충전하기 위해 활액 막 조직과 함께 사용할 수도 있다.

본 발명의 한 실시양태에서, 활액 막 조직은 상기 결함 부위에 직접 이식한다. 관절 공간 내로의 상기 이식된 활액 막 조직의 상실을 방지하기 위해서, 상기 결함 부위의 표면은 얇은 생분해성 피복 막으로 피복할 수 있다. 이 피복 막은 인공막일 수도 있고 천연막(예를 들어, 후술하는 바와 같은 활액 막)일 수도 있다. 상기 피복 막은 봉합재, 피브린 글루, 조직 트랜스글루타미나제, 소작요법 등을 이용하여 상기 결함 부위의 에지에 밀봉한다. 활액 막과 함께 봉합재를 병용하는 경우, 상기 봉합재는 적합한 농도의 BMP-2와 같은 변형 인자로 포화시켜 상기 막 내의 활액 세포의 연골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 활액 막은 이식을 위해 함요로부터 제거하거나 매우 작은 단편(즉, 작은 비트로 잘게 썬 것)으로 절단한다. 잘게 썬 활액 막은 약식 콜라게나제 분해 처리 및 트립신 분해 처리(30 분 내지 45 분)를 수행한 후, 수술실에서 신속한 정제를 수행할 수 있다. 대안으로, 형성층 조직을 획득하고 물리적 스크레이핑 및/또는 골막 또는 연골막 조직의 완만한 단백질 분해에 의해 잘 게 썰 수 있다. 잘게 썬 활액 막 또는 형성층 조직은 기질 내로 혼합하고 결함 공간 내의 기질 내로 이식한다. 상기 기질은 주화성 제제/증식제를 함유함으로써 방출 제어형 시스템을 이용하여 세포 및 변형 인자와 함께 전(全)기질을 집단화하여 상기 기질 내에서 연골 조질 변형을 유도하는 것이 바람직하다. 상기 전 기질은 활액 조직 피복 막 또는 결함 공간 내의 기질을 보유하는 다른 막으로 피복될 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 절개된 활액 막 시이트의 하나 이상의 층은, 결함 공간이 충전될 때까지 한 층을 다른 층의 상부에 적층시킨다. 상부층의 에지 및 필요에 따라 하부층의 코너는 결함 에지에 봉합되거나 유착되어 전체 스틱을 계내에 유지할 수 있다. 시이트 사이에는 변형 성장 인자가 침착되어 있어, 바람직하게는 상기한 바와 같은 방출 제어형 전달 시스템을 이용하여 활액 막 시이트의 연골 변형을 유도한다. 이는 시이트들 사이에 조직의 연골로의 변형을 유도하는 변형 인자로 포화된 얇은 기질 층(예를 들어, 피브린 또는 콜라겐)을 침착시킴으로써 수행할 수 있다. 대안으로, 마이크로좀, 마이크로구, 나노구 또는 리포좀 내에 함유된 변형 인자가 기질 없이 활액 막 시이트 사이에 첨가될 수 있다. 다른 실시양태는 시이트들 사이에 변형 인자를 함유하는 에멀션을 배치하는 것이다. 대안으로, 활액 막 시이트는 이식하기 전에 변형 인자를 함유하는 용액에 침지시킬 수 있다.

또한, 상기 실시양태의 잘게 썬 활액 막, 잘게 썬 형성층 조직 및 활액 막 시이트는 1회의 동결-해동 주기를 통해 부분적으로 제활력화시켜 세포 밀도를 감소시키고, 원하지 않는 세포의 존재를 감소시킬 수 있다. 대안으로, 항-대식세포 항 체 또는 다른 물질을 이용하여 대식세포 군집을 결손시킬 수 있다.

또한, 부분적으로 변형된 활액 막 조직은 결함 공간을 충전시킬 수 있다. 첫번째 외과적 개입에서, 느린 방출을 위해 변형 성장 인자로 포화된 기질 패드는 봉합하고, 관절내 활액 막의 함요에 부착하거나 또는 대안으로 활액 캡슐 직외부의 활액 막 조직에 부착시킨다. 이러한 개입을 수해하고 8일 내지 14일이 경과한 후, 상기 기질 패드 하부의 조직은 연골 유사 조직으로 변형된다. 이어서, 이를 제거하고, 결함 부위내의 다른 층의 상부에 한 층을 적층하여 부분적으로 변형된 활액 조직으로 결함 공간을 충전시킨다. 추가의 변형 인자 뿐만 아니라 당업계에 공지된 유지 인자(예를 들어, IGF I, IGF II 및 IGF-BP's)를 상기 조직 적층물의 층 사이에 첨가할 수 있다.

결함이 연골하골 및 연골하골 골수 공간(또는 과도하게 혈관형성된 활액 막 근처)와 같은 혈관형성된 조직으로 연장되는 부위에서, 내방성장 혈관이 결함내 수복 조직을 오염시킬 수 있는 가능성이 존재한다. 이러한 원하지 않는 혈관 내방성장을 방지하기 위해서, 항혈관형성 인자를 상기 기질에 첨가하거나, 활액 조직 층 사이에, 활액 비트 중에 또는 활액 유도 이식된 연골세포 또는 활액 세포 중에 침착시킬 수 있다.

활액 세포의 용도

상기한 바와 같이 얻은 활액 막 샘플은 부분적으로 분해하여 개별 활액 라이닝 세포 및 활액하 섬유아세포 유사 세포가 막 조직으로부터 방출되도록 한다. 표준 트립신 처리를 이용하거나, 또는 주위 조직으로부터 세포를 분리시키는 기타 수 단을 사용할 수 있다. 개별 세포는 (예를 들어, 피콜 밀도 구배를 통한 차등 침강에 의해) 수집하고, 세포의 신속한 증식 및 증대를 보장하는 표준 세포 배양 조건 하에서 시험관내 배양한다(이 단계에서는 더 신속한 수행을 위해 증식제를 첨가할 수도 있다). 활액 세포 배양 기법은 당업계에 공지되어 있다[참조: Taguchi, K.등, Cell Struct. Funct., 22, pp. 443-53 (1997), Rodel, J. 등, Exp. Toxicol. Pathol., pp. 243-7 (1996)]. 수주내에, 상기 활액 세포는 결함의 크기에 따라 결함 부위 내로 이식하기에 충분한 수(예를 들어, 용액 또는 기질 1 ml 당 10,000 내지 300,000 세포)로 증대될 것이다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 배양된 활액 세포는 시험관 내에서 분화하도록 유도된다. 중배엽성 줄기 세포는 시험관내에서 분화하도록 유도될 수 있는 것으로 확인되었다[참조: Caplan 및 Haynesworth, 미국 특허 제5,486,359호]. 또한, 시험관 내에서 BMP(골형성 단백질)로 자극된 활액 유도 중배엽 유형 세포는 연골로 분화되는 것으로 확인되었다[참조: Iwata 등, Clin. Orthop, 296, pp. 295-300 (1993)].

이러한 실시양태에서, 환자로부터 제거된 활액 세포는 TGF-β 및/또는 BMP(바람직한 농도는 후술함)의 존재 하에서 배양하여 연골세포로의 분화를 유도한다. 이어서, 형성된 연골세포는 이미 바람직한 실시양태를 통해 기술한 바와 같이 결함 부위 내로 이식하는데 현탁액 또는 기질 시스템의 부분으로서 이식한다.

추가의 실시양태에서, TGF-β 및/또는 BMP에 의해 연골세포로 분화하도록 유도된 활액 세포는 시험관 내에서 연골 조직을 생성하는 것이 가능하다. 따라서, 생 성된 연골 조직은 상기 결함에 알맞게 들어맞는 연골 조직의 크기와 형태를 성형한 후 결함 부위 내로 이식한다. 대안으로, 연골 기질은 부분 효소 분해하여 연골-생성 연골세포를 수집하고, 이를 현탁액 또는 덩어리로 이식한다.

<u>활액 조직 피복 막의 용도</u>

피복 막으로서 활액 막을 이용하는 경우, 부분 제활력화 단계를 수행하는 것이 바람직한데, 그 이유는 이 조직이 연골 조직 형성을 위해 이상적이지 않은 대식세포를 함유하므로, 대식세포가 염증 세포의 증식을 유도할 수 있거나, 또는 혈관을 유도할 수 있는 신호 물질을 생성할 수 있어, 결과적으로 원하지 않는 골화를 유도하기 때문이다. 대식세포는 활액 피복 막 내의 세포 수를 감소시키는 일회의 급속 냉동 및 해동 과정을 통해 제거할 수 있다. 이는 주로 대식세포를 제거하지만, 중배엽성 세포수는 감소됨에도 불구하고 연골세포 형성을 위해 적절히 유지됨으로써 실질적인 연골 형성이 이루어진다. 또한, 세포 밀도 감소에 의한 부분 제활력화는 수복 조직 내에서 연골 형성을 위한 더 적합한 생리적 세포 밀도를 생성할 것이다. 대식세포(예를 들어, 항-대식세포 항체)를 제거하기 위해 당업계에 공지된 방법을 대체적인 방법으로 이용하거나 병용할 수 있다.

상기한 바와 같이 결함을 피복하기 위한 즉각적인 활액 조직 자가이식 대신에, 예비형성된 활액 막을 사용할 수도 있다. 이 방법에서는 2단계 외과술 방법을 이용한다. 제1 단계는 관절 찰영 내시경 개입 단계인데, 이때 변형 인자(예를 들어, BMP-2, TGF-β)로 포화된 기질 패드는 (1) 함요 내의 활액 막, (2) 지방 패드를 포함하는, 활액 공간 바로 외부의 활액 조직, 또는 (3) 활액 라이닝 세포에 근 접한 활액하 결합 조직에 봉합한다. 상기 사양 (2) 및 (3)을 선택하는 경우 관절을 절개하니 않아도 되는 잇점이 있다. 3주 내지 4주후, 이 기질 패드를 근접시키면, 활액 막은 연골 유사 조직으로 변형될 것이다. 제2 단계는 외과적 개입 단계인데, 이때 연골 유사 조직 부위는 절개하고, 결함 부위 내로 이식하여 결함을 충전 및/또는 피복한다. 매우 얇은 관절 연골 층을 보유하는 소 관절(예를 들어, 손가락 관절)에서, 이렇게 부분적으로 변형된 활액 막은 전체 결함 공간을 충전하기에 충분할 수 있다. 무릎 관절 내에서 유도되고 작은 손가락 관절(또는 다른 관절)에 자가이식된 이렇게 부분적으로 변형된 활액 막은 재구성용으로 유용할 수 있다.

조직 및/또는 기질 물질을 보유하기 위한 피복물로서 본 발명에 따라 사용된 활액 막 피복 막은 역으로 또는 생리적 방향으로 배향할 수 있으며; 각각의 방식은 효과적일 것이다. 이는 전혀 제활력화되지 않은 물질 또는 부분적으로 제활력화된 물질로 적용하여 결과의 최적화를 위해 특정 세포 유형을 제거할 수 있다.

본 발명에 따른 활액 피복 막의 용도를 포함하는 한 실시양태에서, 활액 피복 막을 이용하여 전두께 결함의 바닥을 피복하거나, 마이크로골절된 전두께의 기저부 표면 또는 얇은 결함(연골하골판에 이르는 것임)을 피복할 수 있다. 이러한 피복 막은 이들 결함에서 구조적 및 기능적 배리어로서 작용할 수 있다. 하나 이상의 출혈점을 함유하는 전두께 결함 또는 얇은 결함에서, 골생성 인자, 필요에 따라 방출 제어형 시스템(예를 들어, 마이크로구, 리포좀 또는 기질내에 함유된 것)을 구비한 골생성 인자는 상기 결함의 골 부분의 기저에 위치하여 첫번째 활액 피복 막으로 피복된다. 혈액내의 인자들이 골 형성을 촉진시킬 것이지만, 필요에 따라, 혈관형성제를 상기 첫번째 활액 피복 막 아래에 위치시켜 골 형성을 추가로 촉진시킬 수도 있다. 상기 첫번째 활액 피복 막은 봉합재, 소작요법, 글루, 기타 수단을 이용하여 적소에 유지하거나, 이들을 전혀 사용하지 않고도 적소에 유지할 수 있다. 항혈관형성제는 첫번째 활액 피복 막의 주변에서 사용하여 상기 연골 수복 공간으로 혈관이 침입하는 것을 방지할 수 있다.

제1 활액 피복 막 위, 즉 상기 결함의 골부에 인접하지 않는 부분에서, 연골발생 제제는 연골 형성을 촉진시키는 기질와 함께 또는 단독으로 사용할 수 있다. 활액 막의 스택은 연골발생 제제를 개재시켜 상기 결함을 충전하는 데 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 세포 기초한 요법을 활액 막 스택 대신에 사용하여(기질와 함께 또는 단독으로) 연골 형성을 촉진시킬 수도 있다. 상기한 바와 같은 세포 기초한 요법은 활액 세포, 연골세포, 골수 기질 세포, 연골발생 유전자로 형질감염된 세포 또는 임의의 연골발생 세포/기질 시스템의 이용을 포함한다.

연골발생 세포/기질 시스템으로 충전된 후, 상기 결함 공간의 정상부는 연골발생 제제 상부를 직접 피복할 수 있는 제2 활액 피복 막으로 피복하여 그의 연골 조직으로의 완전한 변형을 촉진하고, 동시에 상기 결함 공간을 충전하는 연골발생 세포/기질 시스템을 위한 보유 장치로서 기능하는 것이 바람직하다.

상기 실시양태에 따른 제1 활액 피복 막은 전두께 결함 내에서 3가지 수복 기능을 수행하는 고정 장치로서 작용할 수 있다: (1) 전두께 결함의 골부와 마주하는 활액 피복 막의 측면 또는 얇은 결함의 출혈점은 약 1주 내지 4주의 기간에 걸쳐 골 형성에 참여하고, 새롭게 형성된 골과 융합할 것이다; (2) 상기 결함의 골부 로부터 이격되어 마주하는 활액 피복 막의 측면은 연골 형성에 참여하여 실질적으로 새롭게 형성된 연골과 융합할 것이다. (3) 제1 활액 피복 막 자신은 상기 결함의 지방 조직으로부터 또는 골부로부터 혈관 상향 성장에 대한 일시적인 배리어로서 기능할 것이며, 또한 상기 결함의 연골 수복 공간 내로 뼈 및 지방 조직으로부터 유래하는 다양한 기원의 줄기 세포에 의한 원하지 않는 이동 및 형질감염에 대한 배리어로서 기능할 것이다.

기질 및 기타 수복 물질

연골 결함을 충전하거나, 그렇지 않으면 연골 결함을 드레싱하기 위한 본 발명의 방법에 유용한 기질 물질은 피브리노겐(트롬빈에 의해 활성화되어 결함 또는 병변내에 피브린을 형성함), 콜라겐, 아가로즈, 젤라틴 및, 기질 내에서 활액 세포 또는 연골세포의 군집화 및 증식을 가능하게 하고 수복 과정중 분해되어 연골로 대체될 수 있는 임의의 기타 생분해성 물질을 포함한다.

본 발명의 방법에 유용한 기질은 예를 들어, 피브린 기질을 형성하기 위한 피브리노겐과 같은 화합물 및 조성물을 중합함으로써 계내에서 예비형성되거나 형성될 수 있다. 예비형성될 수 있는 기질로는 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 스폰지 및 콜라겐 플리스), 화학적으로 개질된 콜라겐, 젤라틴 비드 또는 스폰지, 젤-형성 물질, 예를 들어 아가로즈, 및 상기 결함을 충전하고 배양되거나 천연의 활액 세포 또는 연골세포를 기질로 군집화할 기질 물질, 또는 이의 혼합물을 들 수 있다.

본 발명의 한 실시양태에서, 상기 기질은 피브리노겐 및 저민 활액 조직을이용하여 형성되는데, 사용 직전에 트롬빈을 첨가하여 중합을 개시시킨다. 수성 완충 액의 피브리노겐 농도 0.5 내지 5 mg/ml를 사용할 수 있다. 수성 완충액의 1 mg/ml의 피브리노겐 용액을 사용하는 것이 바람직하다. 결함 부위 내에서 상기 피브리노겐 용액의 중합은 세공 크기가 충분히 커(예를 들어, 약 50 내지 200 μM) 활액 세포 또는 연골세포가 자유롭게 기질을 군집화하고 증식하여 기질이 점유하는 결함내 용적을 충전할 수 있는 기질을 산출한다. 적용하기 직전에 상기 피브리노겐 용액에 충분한 양의 트롬빈을 첨가하여 중합이 완료되기 이전에 외과의사로 하여금 결함 부위 내에 상기 물질을 침착시킬 수 있는 충분한 시간을 제공할 수 있다. 전형적으로, 상기 트롬빈 농도는, 중합이 수분(2-4분) 내에 이루어질 수 있게끔 하는 농도이어야 하는데, 그 이유는 연골이 공기 중에 장시간 노출되면 손상될 수 있기 때문이다[참조: Mitchell 등, J. Bone. Joint Surg., 71A, pp. 89-95 (1989)]. 과량의 트롬빈을 사용하여서는 아니되는데, 그 이유는 트롬빈이 성장 인자 분자를 절단하여 그들을 불활성화시킬 수 있는 능력을 보유하고 있기 때문이다. 피브리노겐 용액에 첨가하기 위해, 수성 완충액 1 ml 당 10 내지 500 유니트의 트롬빈 용액, 바람직하게는 1 ml 당 100 유니트의 트롬빈 용액을 제조할 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 결함을 충전하기 약 200초 전에 약 20 ㎕의 트롬빈(100 U/㎖)을 피브리노겐 용액(1 ㎎/㎖) 1 ㎖씩과 혼합한다. 낮은 농도의 트롬빈이 첨가되면, 중합반응은 더 서서히 일어날 것이다. 2-4분내에 피브린 중합반응이 일어나는 데 필요한 트롬빈 용액의 양은, 환경 온도, 트롬빈 용액의 온도, 피브리노겐 용액의 온도 등에 의존하기 때문에, 대략적으로만 제공할 수 있다. 대안으로, 편리에 따라, 용액을 결함 부위에 배치한 후 기질 용액의 상부에 배치하 고, 그 용액을 통해 확산되도록 하여 트롬빈을 첨가할 수 있다. 결함을 충전하는 트롬빈 활성화 기질 용액의 중합 반응은 피브리노겐 용액 외부 샘플의 트롬빈 유도 중합 반응을 관찰함으로써 쉽게 모니터된다. 본 발명의 조성물 및 방법에서, 피브린 기질은 처리하고자 하는 종과 동일한 포유동물 종의 혈액에서 유도된 피브리노겐 분자로 형성된다. 또한, 다른 종으로부터 유래한 비면역발생 피브리노오겐도 사용할 수 있다.

피브린 및 콜라겐, 또는 더 바람직하게는 피브린 및 젤라틴을 포함하는 기질은 또한 본 발명의 조성물 및 방법에 사용할 수 있다. 콜라겐성 기질은 전두께 결함을 비롯한 연골 결함의 수복에 사용할 수도 있다. 깊은 전두께 결함의 골 부분을 수복하는 데는 미국 특허 제5,270,300호 및 제5,853,746호에 개시된 절차를 이용할 수 있다.

기질 물질로서 콜라겐을 사용하는 경우, Collagen-Vliess(등록상표)('fleece'), Spongostan(등록상표), 또는 젤라틴-

혈액-혼합물을 사용하여 충분히 점성인 용액을 만들 수 있어서, 중합화제는 불필요하다. 콜라겐 기질 또한 중합화제에 의해 활성화된 피브리노겐 용액과 함께 사용하여 혼합 기질을 형성할 수 있다.

중합화제는 또한 다른 생분해성 화합물을 사용하여 기질을 형성하는 경우에는 불필요할 수 있다. 예를 들면, Sepharose(등록상표) 용액을 선택할 수 있는데, 이것은 39-42℃에서는 기질 용액이 액체상이고 35-38℃에서는 고체상(즉, 겔상)이 된다. Sepharose의 농도는 또한, 결함을 충전하는 겔이 기질 및 결함 부위에 활액 유도 수복 세포 또는 연골세포로 자유롭게 집단화 할 수 있는 메쉬 크기를 갖도록 하는 것이어야 한다.

변형 인자 및 기질의 용도

결함 부위에 존재하는 이식된 활액 막 조직 또는 활액 세포 현탁액은 궁극적으로는 성숙한 연골 조직을 형성하는 연골세포로 부분 자발적으로 변형되지만, 초기에는 프로테오글리칸 분해 효소로 처리된 표면에 부착한다[Hunziker, E. B. 등, J. Bone Joint Surg. Br., 80(1), pp. 144-50(1998)]. 적당한 농도의 변형 인자, 예컨대 변형 성장 인자 β(TGF-β), 골 형태 발생 단백질(BMP's)[Majumdar, M. K., J. Cell. Physiol., 189(3), pp. 275-84(2001)], 연골 유도 형태 발생 단백질(CDMP)[Luyten, F. P., Acta Orthop. Scand. Suppl., 266, pp. 51-4(1995)], 인디안 고슴도치 단백질(IHH 단백질)[St-Jacques, B. 등, Genes Dev., 13(16), pp. 2072-86(1999)], 음파 고슴도치 단백질(SHH 단백질)[Iwamoto, M. 등, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 10(4), pp. 477-86(1999)] 또는 SOX-9[Kolettas, E. 등, Rheumatology, 40(10), pp. 1146-56(2001)]를 이식된 활액 조직에 첨가하여 연골세포로의 균질한 분화를 유도할 수 있다. 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템으로 투여되는 것이 바람직하다. 연속 증식 및 연골 형성에 의해 결함 부위가 충전됨으로써, 결함이 수복된다. 새로운 연골이 형성되어 조밀하게 됨에 따라, 그것이 생분해성 기질을 대체하고 얇은 피복 막이 수복 세포에 용해되거나 그것과 일체화되어 수복된 병변을 남기고 없어진다. 또한, 당해 기술 분야에 공지된 유지 인자(예를 들면, IGF I, IGF II 및 IGF-BP's)를 사용하여 결함 내의 수복 세포 집단을 안정화 시킬 수 있다.

연골 수복을 촉진시키는 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 변형 인자에는 임의의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 활액-유도 수복 세포의, 연골-특이성 프로테오글리칸 및 II형 콜라겐을 생성하는 연골세포로의 분화를 유도하는 임의의 다른 화합물 또는 조성물이 포함된다. 변형 인자는 또한 세포를 유도하여 골 또는 다른 세포 형태를 형성할 수 있다. 세포 내의 연골-특이성 프로테오글리칸 및 II형 콜라겐의 생성을 유도하거나 자극하는 화합물 또는 조성물의 능력은 당해 기술 분야에 공지된 분석법을 이용하여 결정할 수 있다[예를 들면, Seyedin 등, 1985, Seyedin 등, 1987; 상기 참조]. 본 발명의 조성물 및 방법에 유용한 변형 인자에는, 예를 들면 TGF-β's, TGF-α's, FGF's(산성 또는 염기성) 및 BMP's, 예컨대 BMP-2가 포함된다. 이러한 변형 인자들은 단독으로 또는 조합 사용할 수 있다. 이러한 인자들의 이량체 또는 다량체 또한 사용할 수 있다. 또한, TGF-β는 EGF와 병용할 수 있다.

특히, 변형 인자로서 TGF-βI 또는 TGF-βII 또는 BMP-2를 사용할 수 있다. 다른 TGF-β 형태(예를 들면, TGF-βIII, TGF-βIV, TGF-βV 또는 TGF-β 아류의 임의의 구성원) 또는 TGF-β 활성을 가진 폴리펩티드(Roberts, 1990, 상기 참조)도 이러한 목적에 유용할 수 있으며, 장래에 검출될 다른 형태의 그러한 물질 및 다른 성장 인자도 유용할 수 있다.

바람직한 실시양태에서, TGF-β 농도는 기질 ㎖당 200 ng 이상인 것이 바람직하고, 용액 또는 기질 ㎖당 500 ng 또는 그 이상인 것이 가장 바람직하다. 대안 으로, 변형 인자로서 BMP를 사용할 수 있는데, 바람직한 농도는 ㎖당 100-2000 ng이다. 활액 세포의 분화를 유도하는 데 바람직한 TGF-β 또는 BMP의 농도는 치료하고자 하는 구체적인 종 또는 개체에 따라 달라질 수 있을 것이다.

본 발명의 조성물의 변형 인자는 기질 내에서 결함 부위에 적용된다. 그래서 이들의 존재는 매우 편중된 부위로 제한된다. 이것은 이들이 관절 부위로 자유롭게 주사 또는 주입되는 것을 피하기 위한 것이다. 그러한 자유로운 주사는 활액 막 주위의 세포를 자극하는 데 역효과를 미쳐서 관절 일출을 일으킬 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 이식하고자 하는 조직 또는 기질은 변형 인자로서 TGF-β 또는 BMP 외에 항혈관생성제를 함유한다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 결함 부위는 전술한 바와 같이 프로테오글리칸 분해 효소 및/또는 유착 강화 화합물로 처리된다. 활액 막 조직 또는 배양된 활액 세포는 먼저 생분해성 기질 시스템에 첨가된다. 이어서 적당한 농도(예를 들면, 조직, 용액 또는 기질 ㎖당 10,000 내지 300,000개의 세포)의 활액 막 조직 또는 세포를 함유하는 기질 시스템이 결함 부위에 이식된다. 전술한 바와 같이, 조직이 관절 공간으로 손실되는 것을 막기 위해 인공 또는 천연의 얇은 피복 막이 결함 표면을 밀봉할 수 있지만, 특히 작은 결함의 경우에는, 결함을 충전하는 데 사용된 활액 막 조직 또는 세포를 함유하는 기질이 결함 내에 잔류하는 경향이 있기 때문에, 피복 막이 필요하지 않을 수 있다. 결함을 충전하는 데 사용된 활액 막 조직 내의 세포는 기질 시스템 내에서 증식하는 경향이 있다.

전술한 바와 같은 기질 시스템을 사용하는 실시양태에서, 변형 인자, 바람직 하게는 TGF-β 아류의 구성원은, 이식

된 활액 세포가 연골-생성 연골세포로의 분화를 유도하도록 이식 시에 기질 시스템 내에 제공된다. 전달 시스템을 변형 인자와 함께 사용하여 이식된 세포가 연속적이고도 장시간 동안 변형 인자에 노출되도록 할 수 있다. 적당한 전달 시스템의 예에는 폴리락테이트 마이크로구 및 리포솜이 포함된다. 전달 스케쥴은 각 사례의 특정한 매개변수, 예컨대 결함 부위의 크기 및 밀도, 소정 시점에서의 표적 세포의 농도 및 사용된 변형 인자에 기초하여 전개될 수 있다. 그러한 시스템은 미국 특허 제5,206,023호에 개시되어 있다.

또한, 결함을 충전하는 데 사용된 활액 막 샘플 또는 세포 현탁액 내의 세포의 농도에 비해 결함이 크면, 결함을 충전하는 활액 세포의 수를 증가시키는 수단으로서 증식제를 활액 막 샘플 또는 기질에 첨가할 수 있다. 증식제(들)는 결함 내의 활액 세포에 증식 효과를 제공하는 데 적당한 농도 범위로 존재해야 한다. 증식제는 또한 세포에 주화성 효과(TGF-β의 경우와 같이)를 제공하는 것이 바람직하나, 특히 피복 물질이 존재하여 결함 공간 내에 조직 및 세포가 유지되는 경우에는 증식 효과만을 가진 인자를 사용할 수 있다. 대안으로, 결함에 존재하는 세포에 주화성 효과를 제공하고, 이어서 세포 증식 효과를 유도하기 위해서는, 두 개의 다른 제제, 즉 각각 특정한 하나의 효과(주화성 또는 증식)를 가진 것들을 사용할 수 있다. 그러한 제제는 미국 특허 제5,206,023호에 설명되어 있다. 피브로넥틴 또는 다른 세포 유착 촉진 인자 또한 미국 특허 제5,206,023호에 개시되어 있는 바와 같이 기질 내에 포함될 수 있다. 전술한 바와 같은 변형 인자의 후속 투여는 활액 막 샘플 또는 세포 현탁액 내의 세포가 연골-생성 연골세포로 분화되도록 유도할 것이 다. 전술한 바와 같은 방출 제어형 전달 시스템을 사용하여 증식제 및 변형 인자 중 어느 하나 또는 양자를 투여할 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 특히 연골 결함이 전두께인 경우에, 1종 이상의 항혈관형성제를, 혈관이 연골 조직 내로 성장하는 것을 방지하는 데 적당한 농도로 활액 조직, 세포 용액 또는 기질에 첨가할 수 있다. 사용할 수 있는 항혈관형성제에는 아래의 있는 골 조직 또는 인접하는 활액 막으로부터의 혈관이 연골 조직 내로 내방성장하는 것을 막는 생물학적 활성을 갖는 임의의 약제를 포함한다. 그러한 항혈관형성제는 미국 특허 제5,853,746호에 기재되어 있다. 본 발명에 유용할 수 있는 항혈관형성제의 몇가지 예는 앞에서 예시하였다. 항혈관형성제는 속방성 활성을 나타낼 수 있도록 자유롭게 이용가능하여야 하며, 서방형, 예를 들면 활성 장기화를 위한 전달 시스템과 관련이 있는 서방성 형태로 존재할 수 있다. 그러한 시스템은 미국 특허 제5,853,746호에 개시되어 있다.

대안으로, 아래에 있는 골수 공간 또는 인접하는 다른 조직으로부터의 혈관 및 혈관주위 세포의 내방성장을 막기 위해서, 활액 막 조직, 세포 또는 기질의 이식 전에 골 조직에 막을 배치함으로써 결함 부위에 골 조직이 형성되는 것을 막는다. 미국 특허 제5,270,300호 및 제5,853,746호를 참조할 수 있다. 또한 염증성 세포에 의한 오염을 막기 위해 방출 제어형 전달 시스템에 항염증제를 첨가할 수도 있다.

활액 조직 또는 세포의 시험관내 세포 배양 또는 계내 변형을 포함하는 상기 실시양태에서, 활액 세포는 안정하거나 1종 이상의 연골발생 유전자에 의해 일시적 으로 형질감염될 수 있다. 시험관내 세포 배양물의 경우에, 그것은 결함으로의 이식 전에, 시험관내 세포 배양 과정 중에 일어날 것이다. 계내 변형의 경우에, 당해 기술 분야에 공지된 수단, 예를 들면 리포솜 또는 아데노비루스 벡터에 의해 계내의 형질감염을 수행할 수도 있다.

형질감염된 연골발생 유전자를 포함하는 한 실시양태는 결함에 선택된 형질감염 매질을 삽입한 활액 막 조직 스택을 계내 형질감염을 수행하는 데 사용하는 것이다. 연골발생 유전자의 예에는 BMP, BMP-2, BMP-9, TGF-β, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9가 포함되는데, 이들에 한정되는 것은 아니며, 당해 기술 분야에 공지된 방법, 예컨대 전기영동, 리포솜 전달 및 비루스 벡터로 상황에 맞게 형질감염시킬 수 있다. 당해 기술 분야에 공지된 DNA 암호화 연골발생 유전자는 형질감염시키고자 하는 연골발생 유전자(들)의 공개된 DNA 서열로부터 얻은 프라이머 서열을 사용하여 시판 DNA 라이브러리의 PCR 증폭을 통해 얻을 수 있다.

상기 각 실시양태에서, 조직 또는 기질은 수복 조직 부위에 비특이적으로 광화되거나 석회화될 수 있다. 따라서, 비스포스포네이트와 같은 석회화 또는 광화 억제제를 조직 또는 기질에 첨가하여 원치 않는 그러한 광화 또는 석회화를 방지하고 수복 조직의 유리질 같은 특성을 보존할 수 있다. 또한, 연골세포가, 조직 수복 영역을 광화시키는 작용을 하는 비대성 연골세포로 분화되는 것을 억제하는 것이 바람직하다. 이것은 부갑상선 호르몬 수용체 단백질 또는 다른 공지의 활성제를 사용하여 수행할 수 있다.

상기 각 실시양태에서, 활액 막 조직 또는 세포의 이식과, 충전된 결함을 생 분해성 피복 막으로 임의 피복한 후, 관절 공간을 외과술에 의해 그 층들 내부에 봉한다.

본 발명의 방법은 관절 환부에 투여하고 그 위치를 그 환부로 제한하는 간단한 방법에 의해, 사람을 비롯한 동물의 연골 결함을 치료할 수 있다. 완전 치료는 관절 촬영 내시경법, 절개 수술법 또는 경피 요법에 의해 수행할 수 있다.

본 명세서에 설명한 본 발명이 보다 충분히 이해될 수 있도록 하기 위해, 하기 실시예를 제공한다. 이들 실시예는 예시를 목적으로 하는 것이며 어떤 방식으로든 본 발명은 제한하는 것이 아니다.

실시예

실시예 1

생체내 관절 연골 결함을 피복하기 위한 활액 막의 용도

관절 연골 결함을 피복하는 데 연골 막을 사용하는 효과를 시험하기 위해서, 성숙한 염소에 박삭(planing) 기구를 이용하여 폭 5 ㎜, 길이 10 ㎜ 및 깊이 0.7 ㎜의 결함을 형성시켰다. 새로운 결함들을 40 ng/㎖ 농도의 유리 증식제(IGF-1) 및 1.0 μg/㎖ 농도의 리포솜-캡슐화 변형 성장 인자(BMP-2)를 함유하는 피브린 기질로 충전하였다. 이어서 그 결함을 관절 벽에서 절개한 동일한 크기의 활액 막으로 피복하고 단일 차단 봉합술을 이용하여 Vycril 7.0 봉합 재료를 사용해 결함 경계를 봉합하였다. 관절을 봉한 후에, 동물의 관절을 4주 동안 부드러운 캐스트에 부동화시켜 유지하였다(n=6 마리). 안락사시켜 조직학 분석을 행한 후, 활액 막이 주위의 연골 조직 경계로 유입되고, 연골과 유사한 조직으로 변형된 것을 확인하였다. 세 마리의 동물에서는 활액 조직이 활액 라이닝(lining) 세포와 함께 관절 공동을 향해 배향되었고, 세 마리에서는 라이닝 세포가 결함 공간을 향해 배향되었다. 두 그룹에서 유사한 결과가 얻어졌다(즉, 피복 막 배향은 본 발명의 방법에서 실질적인 역할을 수행하는 것으로 보이지 않음).

실시예 2 A

생체내 관절 연골 결함을 수복하기 위한 활액 비트의 용도

커다란 관절 연골 결함에서, 활액 막으로부터 관절 연골 결함으로 활액 세포를 이동시켜서 연골세포로 변형하여 연골을 수복시킬 수 있는 세포로 결함을 충전하는 과정은, 외과술 후 수주 내에 세포 증식 및 조직 분화에 의해 완전히 충전하기에는 너무 느리거나 충분한 수의 세포를 제공하지 못할 수 있다. 더 많은 수의 수복용 세포 공급원을 제공하기 위해서, 활액 막 물질을 작은 조직 비트로 절단하고, 피브린 기질에 혼합하여 결함 내에 변형 인자와 함께 침착시켰다. 이어서 결함을 상기 실시예 1에서 설명한 바와 같이 활액 피복 막으로 피복하였다. 실험 내용 모두는 피브린 기질에 활액 비트를 첨가한 것을 제외하고는 전술한 바와 같이 하였다. 동물을 죽였을 때, 많은 부위의 조직 변형이 존재하였고, 수복 세포의 수는 새로운 연골 조직을 형성하기에 충분하였다.

실시예 2 B

이식 전의 활액 조직의 부분 제활력화

실험 2 A(상기)를 변경시켜서 이식된 활액 피복 막을 한번에 동결시키고 즉시 해동하였다. 이것은 활액 조직에 존재하는 대식 세포의 수를 줄이기 위해 활액 조직 비트에 대해서도 수행하였다. 이 단계를 추가함으로써, 연골 조직의 더 균질한 변형이 실현되었다.

실시예 3

생체내 관절 연골 결함의 수복을 위한 활액 막 스택의 용도

실시예 1(상기)에서 설명한 실험을 변경시켜 결함 자체와 대략 크기가 같은 활액 막 스택으로 결함을 충전하였다. 결함에 배치하기 전에, 각 활액 막을 4.4 ㎎/㎖ 농도의 BMP-2 용액에 침지시켜 연골 조직으로의 변형을 유도하였다. 또한, 활액 막 층들 사이에 변형 인자(BMP-2, 4.4 ㎎/㎖)를 함유하는 소량의 피브린 기질 또는 대식 세포를 침착하여 변형 인자의 방출 제어를 가능하게 하였다. 육안 관찰 결과, 활액 조직이 연골과 유사한 조직으로 변형된 것으로 보였다.

실시예 4

생체내 관절 연골 결함을 수복하기 위한 배양 활액 세포의 용도

실시예 1(상기)에 설명된 것과 유사한 결함의 치료는, 적당량의 활액 막 및/또는 활액 유체를, 바람직하게는 수복하고자 하는 관절에서 추출하는 외과적 개입 과정 후에, 얻어진 활액 세포를 용액 ㎖당 10,000 내지 300,000 세포 농도에 도달할 때까지 시험관내에서 배양함으로써 수행할 수 있었다. 증식제를 사용하여 배양된 활액 세포 집단의 증대를 촉진시킬 수 있었다.

이어서 배양된 활액 세포 집단을 현탁액 중의 결함 부위에 직접 이식하였다. 국부 마취 하에, 관절 촬영 내시경 또는 외과적 개입을 수행하였다. 멸균 흡수성 티슈를 사용하여 결함의 표면을 블로팅함으로써 그 부위를 건조시키고, 결함부피 를 2-10분 동안 멸균 프로테오글리칸 분해 효소 용액으로 충전하는 연골의 표면에 존재하는 프로테오글리칸을

국부적으로, 결함의 표면으로부터 약 1 내지 2 ㎛ 깊이까지 분해시켰다. 이어서 프로테오글리콘 분해 효소를 제거하고 결함을 세정하였다.

현탁액 또는 기질(바람직한 농도는 용액 또는 기질 ㎖당 10,000 내지 300,000 개의 세포임) 중에서, 배양된 활액 세포를, 바람직하게는 TGF-β와 같은 변형 인자와 함께 결함 부위에 이식하여 활액 세포의 연골 생성 연골세포로의 분화를 촉진시켰다. 이식된 세포가 관절 공간으로 손실되는 것을 막기 위해서, 결함 부위의 표면을 얇은 생분해성 피복막, 바람직하게는 활액 막으로 피복하였다. 피복 막을 봉합술, 피브린 글루, 조직 트랜스글루타미나제 등에 의해 결함 부위의 단부에 밀봉한다. 활액 피복 막과 관련하여 봉합술이 이용되는 경우, 봉합 재료를 적당한 농도의 BMP-2와 같은 변형 인자로 포화시켜서 피복 막 중의 활액 세포의 연골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있었다.

배양된 활액 세포로 이식시키고 생분해성 피복 막으로 피복한 후, 관절 공간을 외과술에 의해 층 내에 봉하였다.

실시예 5

계내 활액 조직의 변형

계내에서 BMP-2에 의한 활액 조직의 변형 과정을 성숙한 토끼에서 시험하였다. 각 그룹이 5 마리의 토끼로 구성된 5개의 그룹에 대해 연구를 수행하였다. 100 ng/㎖ 농도의 BMP-2가 부하된 리포솜을 함유하는 콜라겐성 기질을 각 동물의 무릎 관절에 있는 활액 막에 봉합하였다. 콜라겐성 기질로 이식한 후, 관절 공간을 외과술에 의해 층 내에 봉하였다.

0일째, 6일째, 8일째, 12일째 및 14일째에 관절 조직학을 시험하였다. 전체 관절이 플라스틱 내에 고정, 매립되었으며, 그 후 1.5 ㎜ 연속 구간이 형성되었다. 이러한 방식으로 시간 경과에 따른 조직 조성의 변화를 관찰할 수 있었다. 4종류의 조직, 즉 (1) 정상 활액 조직; (2) 신생 결합 조직; (3) 신생 연골; 및 (4) 신생 골(골수 포함)인 것으로 확인할 수 있었다.

6일째에, 정상 활액 조직과 신생 결합 조직만이 관찰되었다. 8일째에, 연골성 부위가 나타났다. 10일째에, 신생 연골이 다량 얻어졌다. 12일째에, 골 부위가 나타났고, 14일째에, 연골 외에 상당량의 골이 보였다. 이러한 결과는 무릎 관절 내의 활액 조직이 적당한 조건 하에서 연골과 골로 변형할 수 있는 성숙한 줄기 세포를 함유한다는 것을 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막 조직의 일부를 제거하는 단계, 및

활액 막 조직으로 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 2.
제1항에 있어서, 상기 활액 막 조직은 생분해성 기질과 혼합하고, 양쪽 물질을 결함 내에 이식하는 것인 방법.

청구항 3.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막 조직의 단편을 제거하는 단계,

활액 막 조직 내의 활액 세포를 연골세포로 변형시킬 수 있는 유효량의 변형 인자를 활액 막 조직의 단편에 첨가하는 단계, 및

변형 인자 및 활액 막 조직의 단편으로 관절 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 4.
제3항에 있어서, 변형 인자는 TGF-β's, BMP's, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 5.
제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 활액 막 조직 내에 존재하는 세포를, BMP, BMP-2, BMP-9, TGF-β, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에 서 선택된 하나 이상의 연골발생 유전자로 형질감염시키는 단계로서, 상기 형질감염은 활액 세포의 연골세포로의 변형을 수행하는 하나 이상의 변형 인자를 생성시키는 것인 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 6.
제3항에 있어서, 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템과 관련있는 것인 방법.

청구항 7.
제6항에 있어서, 방출 제어형 전달 시스템은 리포좀, 마이크로구, 생체침식성 중합체, 헤파린 설페이트 프로테오글리칸에 화학적으로 연결된 콜라겐 섬유, 및 탄수화물계 소체로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 8.
제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 활액 피복 막은 결함을 피복하는 데 사용하는 것인 방법.

청구항 9.
제8항에 있어서, 활액 피복 막은 사용하기 전에 부분적으로 제활력화시키는 것인 방법.

청구항 10.
제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 결함 부위를 광화 억제제로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 11.
제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 결함 부위를 석회화 억제제로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 12.
생분해성 기질 또는 기질 형성 물질,

활액 막 조직의 단편의 제제, 및

활액 막 조직 내의 활액 세포를 연골세포로 변형시키는 유효량의 변형 인자

를 포함하는, 관절 연골 결함 치료용 조성물.

청구항 13.
제12항에 있어서, 변형 인자는 TGF-β's, BMP's, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 14.
제12항에 있어서, 활액 세포의 증식을 자극시키는 유효량의 증식제를 더 포함하는 조성물.

청구항 15.
제12항에 있어서, 연골 결함 내에서 혈관 및 골 조직 형성의 내방성장을 방지하는 유효량의 항혈관형성제를 더 포함하는 조성물.

청구항 16.
제12항에 있어서, 유효량의 광화 억제제를 더 포함하는 조성물.

청구항 17.
제12항에 있어서, 유효량의 석회화 억제제를 더 포함하는 조성물.

청구항 18.
활액 막 내의 활액 세포가 연골세포로 변형되도록 사람을 비롯한 동물의 활액 막에 인접하게 변형 인자 침지된 패드를 배치하는 단계, 및

형성된 연골세포 함유 조직으로 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 19.
제12항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 기질의 결함 부위로의 유착을 강화시키기 위해서 피브린 글루, 트랜스글루타미나제 또는 피브로넥틴을 더 포함하는 조성물.

청구항 20.
결함을 치료하기 위한 치료 제제로 결함을 충전시키는 단계, 및

활액 피복 막으로 결함을 피복시키는 단계

를 포함하는, 사람을 비롯한 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 21.
제20항에 있어서, 활액 피복 막이 자가이식성인 방법.

청구항 22.
제20항에 있어서, 활액 피복 막이 이종이식성인 방법.

청구항 23.
제20항에 있어서, 유효량의 변형 인자는 활액 피복 막 내의 활액 세포의 연골세포로의 변형을 촉진하기 위해 활액 피복 막과 함께 존재하는 것인 방법.

청구항 24.
제20항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 활액 피복 막은 사용하기 전에 부분적으로 제활력화시키는 것인 방법.

청구항 25.
제23항에 있어서, 변형 인자는 TGF-β's, BMP's, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 26.
활액 피복 막을 포함하는, 연골내 결함 치료용 조성물.

청구항 27.
제26항에 있어서, 활액 세포의 연골세포로의 변형을 촉진시키는 유효량의 변형 인자를 더 포함하는 조성물.

청구항 28.
제27항에 있어서, 변형 인자는 TGF-β's, BMP's, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 29.
제26항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, 활액 피복 막은 사용하기 전에 부분적으로 제활력화시키는 것인 방법.

청구항 30.
제1항 내지 제11항 또는 제18항 중 어느 하나의 항에 있어서, 결함 표면 상의 프로테오글리칸을 분해시키는 제제로 결함을 처리하는 단계, 및 결함을 충전시 키기 전에 상기 제제를 제거하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 31.
제30항에 있어서, 프로테오글리칸을 분해하는 제제가 콘드로이티나제 AC인 방법.

청구항 32.
제2항에 있어서, 기질은 피브린, 콜라겐, 겔라틴, 아가로즈 및 이들의 조합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 33.
제8항 또는 제20항에 있어서, 변형 인자 내에 침지된 봉합재는 피복 막을 결함 경계에 부착하는 데 사용하는 것인 방법.

청구항 34.
자가이식성 활액 막 조직으로 결함을 충전시키는 단계, 및

이종조직성 활액 피복 막으로 결함을 피복하는 단계

를 포함하는, 사람을 비롯한 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 35.
제34항에 있어서, 유효량의 변형 인자는 활액 막 내의 활액 세포의 연골세포로의 변형을 촉진시키는 자가이식성 활액 막과 함께 존재하는 것인 방법.

청구항 36.
다수의 지점에서 결함의 기저부에 있는 연골하 골 판을 천공하는 단계,

막으로 결함 기저부를 피복하는 단계,

결함의 기저부와 막 사이에 골형성 인자 및/또는 혈관형성 인자를 침착시키는 단계,

막 상부에 그리고 막과 연골 결함의 정상부의 평면 사이에 세포 현탁액, 기질 내의 세포, 활액 막 조직 및 기질 내의 활액 막 조직으로 이루어진 군 중에서 선택된 연골발생 제제를 침착시키는 단계, 및

피복 막으로 결함을 피복하는 단계,

를 포함하는, 관절 연골 결함 내에 배치된 세포 또는 조직을 고정시키는 방법.

청구항 37.
제36항에 있어서, 막과 피복 막 사이에 변형 인자를 배치하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 38.
제36항에 있어서, 막과 피복 막 사이에 항혈관형성 인자를 배치하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 39.
제36항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, 막과 피복 막은 활액 막을 포함하는 것인 방법.

청구항 40.
제36항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 있어서, 변형 인자는 TGF-β's, BMP's, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 41.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막의 일부를 제거하는 단계,

제거된 활액 막으로부터 활액 세포를 얻는 단계,

시험관내에서 활액 세포를 배양 및 증식시키는 단계, 및

배향된 활액 세포로 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 42.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막의 일부를 제거하는 단계,

제거된 활액 막으로부터 활액 세포를 얻는 단계,

시험관내에서 활액 세포를 배양 및 증식시키는 단계,

생분해성 기질 내에 배양된 활액 세포를 이식하는 단계, 및

배양된 활액 세포를 함유하는 기질로 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 43.
제41항 또는 제42항 있어서, 유효량의 변형 인자도 연골 결함을 충전시키는 데 사용하는 것인 방법.

청구항 44.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막의 일부를 제거하는 단계,

제거된 활액 막으로부터 개별 활액 세포를 얻는 단계,

시험관내에서 활액 세포를 배양 및 증식시키는 단계,

활액 세포의 연골세포로의 분화를 유도하는 변형 인자로 활액 세포를 자극시키는 단계, 및

연골세포의 현탁액으로 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 45.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막의 일부를 제거하는 단계,

활액 막으로부터 활액 세포를 얻는 단계,

시험관내에서 활액 세포를 배양 및 증식시키는 단계,

활액 세포의 연골세포로의 분화를 촉진시키는 변형 인자로 활액 세포를 자극시키는 단계,

생분해성 기질 내에 연골세포를 이식하는 단계, 및

연골세포를 함유하는 기질로 연골 결함을 충전하는 단계

를 포함하는 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 46.
제41항, 제42항, 제44항 또는 제45항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유효량의 항혈관형성제도 혈관 조직 및 골 조직 형성의 내방성장을 방지하기 위해서 연골 결함을 충전시키는 데 사용하는 것인 방법.

청구항 47.
사람을 비롯한 동물로부터 활액 막의 일부를 제거하는 단계,

제거된 활액 막으로부터 개별 활액 세포를 얻는 단계,

시험관내에서 활액 세포를 배양 및 증식시키는 단계,

활액 세포의 연골세포로의 분화를 유도하는 변형 인자로 활액 세포로 자극시키는 단계,

시험관내에서 연골세포를 자극하여 연골 기질을 생성시키는 단계, 및

연골세포 및 이 연골세포 주위의 연골 기질로 이루어진 형성된 연골 조직으로 연골 결함을 충전시키는 단계

를 포함하는, 상기 동물 내의 관절 연골 결함을 치료하는 방법.

청구항 48.
제47항에 있어서, 연골 결함을 충전시키는 단계 이전에 생성된 연골 기질을 부분 효소 분해로 처리하여 연골 기질 형성 연골세포를 방출시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 49.
제41항, 제42항, 제44항, 제45항, 제47항 또는 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 프로테오글리칸을 분해하는 제제로 결함 부위를 처리하는 단계, 및 결함을 충전시키는 단계 이전에 상기 제제를 제거하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 50.
제49항에 있어서, 프로테오글리칸을 분해하는 제제가 콘드로이티나제 AC인 방법.

청구항 51.
제42항, 제44항 또는 제45항 중 어느 하나의 항에 있어서, 기질은 피브린, 콜라겐, 겔라틴, 아가로즈 및 이들의 조합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 52.
제46항에 있어서, 항혈관형성제는 수라민, 안지오스타틴, 메탈로프로테아제 억제제, 항-bFGF 항체, 항-ESAF 항체, 푸마길린, 및 AGM-1470으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 53.
제44항, 제45항, 제47항 또는 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 변형 인자는 TGF-β's, BMP's, CDMP, IHH, SHH 및 SOX-9로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 방법.

청구항 54.
제47항에 있어서, 연골을 결함 부위 내에 이식하는 단계 이전에, 결함 부위에 맞도록 시험관내에서 생성된 연골의 크기 및 형상을 조절하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 55.
생분해성 기질 또는 기질 형성 물질,

활액 세포의 제제, 및

활액 세포를 연골세포로 변형시키는 유효량의 변형 인자

를 포함하는, 연골내 결함 치료용 조성물.

청구항 56.
제55항에 있어서, 활액 세포의 증식을 자극시키는 유효량의 증식제를 더 포함하는 조성물.

청구항 57.
제55항에 있어서, 혈관의 연골 내로의 내방성장을 방지하는 유효량의 항혈관형성제를 더 포함하는 조성물.

청구항 58.
제55항에 있어서, 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템과 관련있는 것인 방법.

청구항 59.
제41항, 제42항, 제44항, 제45항, 제47항, 제48항 또는 제54항 중 어느 하나의 항에 있어서, 결함을 충전시키는 세포의 손실을 방지하는 피복 막을 사용하여 충전된 결함을 피복하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 60.
제59항에 있어서, 피복 막이 활액 피복 막인 방법.

청구항 61.
제41항, 제42항, 제44항, 제45항, 제47항 또는 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 결함 부위를 광화 억제제로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 62.
제55항에 있어서, 광화 억제제를 더 포함하는 조성물.

청구항 63.
제41항, 제42항, 제44항, 제45항, 제47항 또는 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 결함 부위를 석회화 억제제로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 64.
제55항에 있어서, 석회화 억제제를 더 포함하는 조성물.

청구항 65.
제42항, 제45항, 제47항 또는 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 기질의 결함 부위로의 유착을 강화시키기 위해서 결함 부위를 피브린 글루 또는 트랜스글루타미나제 및/또는 피브로넥틴으로 처리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 66.
제55항에 있어서, 기질의 결함 부위로의 유착을 강화시키기 위해서 피브린 글루 또는 트랜스글루타미나제 및/또는 피브로넥틴을 더 포함하는 조성물.

청구항 67.
제42항, 제44항, 제45항, 제47항 또는 제48항 중 어느 하나의 항에 있어서, 변형 인자는 방출 제어형 전달 시스템과 관련있는 것인 방법.

청구항 68.
제62항에 있어서, 변형 인자 내에 침지된 봉합재는 피복 막을 결함 경계에 부착시키는 데 사용하는 것인 방법.