



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0040293
(43) 공개일자 2014년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61M 1/00 (2006.01) A61M 1/10 (2006.01)
A61M 25/01 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7007674(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년08월28일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2013-7028378
원출원일자(국제) 2006년08월28일
심사청구일자 2013년10월28일
(85) 번역문제출일자 2014년03월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/033415
(87) 국제공개번호 WO 2007/025233
국제공개일자 2007년03월01일
(30) 우선권주장
60/711,501 2005년08월26일 미국(US)
60/815,242 2006년06월19일 미국(US)

(71) 출원인
리전츠 오브 더 유니버시티 오브 미네소타
미국 미네소타 세인트 폴 슈트 160 웨스트게이트
드라이브 1000 (우:55114-8658)
(72) 발명자
오트, 하랄트
미국 02114 메사추세츠주 보스턴 8제이 에머슨 플
레이스 1
테일러, 도리스
미국 55105 미네소타주 세인트 폴 롬바르드 애비
뉴 929
(74) 대리인
김영, 양영준

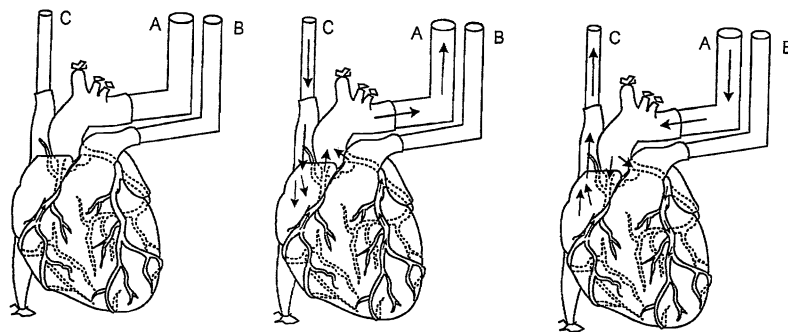
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 기관 및 조직의 세포제거 및 재생포화

(57) 요약

본 발명은 고형 기관을 세포제거시키고, 이러한 세포제거된 기관을 재생포화시킴으로써 고형 기관을 발생시키는 방법 및 물질을 제공한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

기관을 제공하는 단계;

이 기관에 하나 또는 그 이상의 공동, 혈관 및/또는 도관에서 카놀라를 삽입하는 단계; 및

카놀라 삽입된 기관을 하나 또는 그 이상의 카놀라 삽입을 통해서 제 1 세포봉괴 매질로 관류시키는 단계를 포함하는, 기관을 세포제거하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 기관 및 조직, 더욱 특히는 기관 및 조직을 세포제거 및 재생세포화하기 위한 방법 및 물질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생물학적으로 유도된 매트릭스는 조직 공학 및 재생을 위해서 개발되었다. 그러나, 현재까지 개발된 매트릭스는 일반적으로 손상된 매트릭스 구조를 갖고/갖거나, 기관 또는 조직의 효과적인 재구성을 허용하는 혈관상(vascular bed)을 나타내지 않는다. 본 출원은 기관 조직의 세포제거 및 재생세포화를 위한 방법을 기술한다.

발명의 내용

[0003] 본 발명은 기관 또는 조직을 세포제거하기 위한 방법 및 물질뿐만 아니라, 세포제거된 기관 또는 조직을 재생세포화하기 위한 방법 및 물질을 제공한다.

[0004] 한가지 관점에서, 본 발명은 세포제거된 포유동물 심장을 제공한다. 세포제거된 포유동물 심장은 외부 표면을 갖는 심장의 세포제거된 세포의 매트릭스를 포함한다. 세포제거된 심장의 세포의 매트릭스는 실질적으로 세포제거 이전의 세포의 매트릭스의 형태학을 유지하며, 세포의 매트릭스의 외부 표면은 실질적으로 손상되지 않는다.

[0005] 대표적인 심장에는 설치류 심장, 돼지 심장, 토끼 심장, 소 심장, 양 심장 또는 개 심장이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 또 다른 대표적인 심장은 인간 심장이다. 세포제거된 심장은 사체의 것일 수 있다. 일부의 구체예에서, 세포제거된 심장은 전체 심장의 일부분이다. 예를 들어, 전체 심장의 일부분은 심장 패취, 대동맥관, 승모판, 폐동맥관, 삼첨판, 우심방, 좌심방, 우심실, 좌심실, 중격, 관상혈관계, 폐동맥 또는 폐정맥을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지는 않는다.

[0006] 또 다른 관점에서, 본 발명은 고형 기관(solid organ)을 제공한다. 본 명세서에서 기술한 것으로서 고형 기관은 상술한 세포제거된 심장 및 여기에 부착된 재생성 세포의 집단을 포함한다. 일부의 구체예에서, 재생성 세포는 전능세포(totipotent cells)이다. 일부의 구체예에서, 재생성 세포는 배아줄기세포, 제대세포, 성체-유래 줄기 또는 선조세포, 골수-유래 세포, 혈액-유래 세포, 중간엽 줄기세포(MSC), 골격근-유래 세포, 다능성(multipotent) 성체 선조세포(MAPC), 심장 줄기세포(CSC), 또는 다능성 성체 심장-유래 줄기세포이다. 일부의 구체예에서, 재생성 세포는 심장 섬유아세포, 심장 미세혈관계 세포 또는 대동맥 내피세포이다.

[0007] 일반적으로, 세포제거된 심장에 부착된 재생성 세포의 수는 적어도 약 1,000 개이다. 일부의 구체예에서, 세포제거된 심장에 부착된 재생성 세포의 수는 약 1,000 세포/조직 mg (습윤 중량; 즉, 전-세포제거된 중량) 내지 약 10,000,000 세포/조직 mg (습윤 중량)이다. 일부의 구체예에서, 재생성 세포는 세포제거된 심장에 대해서 이종이다. 또한 일부의 구체예에서, 고형 기관은 환자에게 이식된 것이고, 재생성 세포는 환자에 대해서 자가 유래하는 것이다.

[0008] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 고형 기관을 만드는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 일반적으로 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포제거된 심장을 제공하고, 세포제거된 심장을 재생성 세포가 세포제거된 심장 내에서 및 그 상에서 생착, 증식 및/또는 분화하는 조건 하에서 재생성 세포의 집단과 접촉시키는 단계를 포함한다. 한가

지 구체예에서, 재생성 세포는 세포제거된 심장 내로 주입 또는 관류된다.

[0009] 또 다른 관점에서, 본 발명은 심장을 세포제거하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 심장을 제공하고, 심장에 하나 또는 그 이상의 공동, 혈관 및/또는 도관 (duct)에서 카놀라를 삽입하여 카놀라 삽입된 심장을 생성하고, 카놀라 삽입된 심장을 하나 또는 그 이상의 카놀라 삽입을 통해서 제 1 세포봉괴 매질로 관류시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 관류는 각각의 카놀라 삽입된 공동, 혈관 및/또는 도관으로부터 다방향성일 수 있다. 전형적으로, 세포봉괴 매질은 SDS, PEG 또는 트리톤 X와 같은 적어도 하나의 세제를 포함한다.

[0010] 이러한 방법은 또한, 카놀라 삽입된 심장을 하나보다 많은 카놀라 삽입을 통해서 제 2 세포봉괴 매질로 관류시키는 단계를 포함할 수 있다. 일반적으로, 제 1 세포봉괴 매질은 SDS와 같은 음이온성 세제일 수 있으며, 제 2 세포봉괴 매질은 트리톤 (Triton) X와 같은 이온성 세제일 수 있다. 이러한 방법에서, 관류는 심장조직의 그람 (습윤 중량)당, 약 2 내지 12 시간 동안 이루어질 수 있다.

[0011] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질은 이하에 기술된다. 또한, 물질, 방법 및 실시예는 단지 설명적인 것이며, 제한적인 것은 아니다. 본 명세서에 언급된 모든 문헌, 특허출원, 특허 및 그 밖의 다른 참고자료는 온전히 참고로 포함된다. 충돌이 있는 경우에, 정의를 포함한 본 명세서가 조절할 것이다.

[0012] 본 발명의 하나 또는 그 이상의 구체예의 상세한 사항은 첨부된 도면 및 이하의 설명에 기술되어 있다. 본 발명의 그 밖의 다른 특징, 목적 및 이점은 도면 및 상세한 설명으로부터, 및 특허청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 심장의 세포제거를 위한 초기 준비를 보여주는 개략도이다. 대동맥, 폐동맥, 및 상대정맥은 카놀라가 삽입되고 (각각 A, B, C), 하대정맥, 완두동맥, 좌총경동맥 및 좌쇄골하동맥은 결찰된다. 화살표는 전행성 및 역행성 관류의 방향을 나타낸다.

도 2는 세포제거/재세포화 장치의 한가지 구체예의 개략도이다,

다양한 도면에서 같은 참조기호는 같은 요소를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 고형 기관은 일반적으로 3 개의 주요 성분, 즉 세포외 매트릭스 (ECM), 그 안에 내장된 세포, 및 혈관상을 갖는다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 고형 기관의 세포제거는 세포외 매트릭스 (ECM) 및 혈관상을 실질적으로 보존하면서 세포성 성분의 대부분 또는 전부를 제거한다. 그 후, 세포제거된 고형 기관은 재세포화를 위한 토대로 사용될 수 있다. 고형 기관이 수득될 수 있는 포유동물에는 설치류, 돼지, 토끼, 소, 양, 개 및 인간이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 본 발명에 기술된 방법에서 사용된 기관 및 조직은 사체의 것일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 언급된 것으로서 고형 기관에는 심장, 간, 폐, 골격근, 뇌, 췌장, 비장, 신장, 자궁 및 방광이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 고형 기관은 "실질적으로 밀폐된" 혈관계 시스템을 갖는 기관을 의미한다. 기관과 관련한 "실질적으로 밀폐된" 혈관계 시스템은 주요 혈관이 카놀라 삽입되고, 결찰되고/거나 다른 식으로 한정되는 것을 가정하여, 액체로 관류시키면 대부분의 액체가 고형 기관 내에 보유되고, 고형 기관 밖으로 누출되지 않는 것을 의미한다. "실질적으로 밀폐된" 혈관계 시스템을 가짐에도 불구하고, 상기 열거된 다수의 고형 기관은 관류 중에 기관 전체에 걸쳐서 액체를 도입하고 이동시키는데 유용한 규정된 "유입 (entrance)" 및 "유출 (exit)" 혈관을 갖는다.

[0016] 상술한 고형 기관 이외에도, 예를 들어, 관절 (예를 들어, 무릎관절, 어깨관절 또는 고관절), 호흡관, 또는 척수의 전부 또는 일부분과 같은 혈관이 분포된 다른 유형의 기관 또는 조직을 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 세포제거할 수 있다. 더구나, 본 명세서에 기술된 방법은 또한 예를 들어, 연골 또는 각막과 같은 무혈관 조직을 세포제거하기 위해서 사용될 수도 있다.

[0017] 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포제거된 기관 또는 조직 (예를 들어, 심장 또는 간) 또는 그의 일부분 (예를 들어, 대동맥관, 승모관, 삼첨관, 폐정맥, 폐동맥, 관상 혈관계, 중격, 우심방, 좌심방, 우심실 또는 좌심실)은 재세포화되거나 되지 않고 환자에게 이식하는데 사용될 수 있다. 대신으로, 본 명세서에 기술된 바와 같은 재세포화된 기관 또는 조직은 예를 들어, 분화를 하고 있는 세포 및/또는 기관 또는 조직의 세포성 조직화를 검사

하기 위해서 사용될 수 있다.

[0018] **기관 또는 조직의 세포제거**

[0019] 본 발명은 포유동물 기관 또는 조직을 세포제거하기 위한 방법 및 물질을 제공한다. 기관 또는 조직을 세포제거하는데 있어서의 초기 단계는 가능하다면, 기관 또는 조직에 카놀라를 삽입하는 것이다. 기관 또는 조직의 혈관, 도관 및/또는 공동에 본 기술분야에서 공지된 방법 및 물질을 사용하여 카놀라를 삽입할 수 있다. 기관 또는 조직을 세포제거하는데 있어서의 다음 단계는 카놀라 삽입된 기관 또는 조직을 세포봉괴 매질로 관류시키는 것이다. 기관을 통한 관류는 다방향성 (예를 들어, 진행성 및 역행성)일 수 있다.

[0020] 심장의 랑겐도르프 (Langendorff) 관류는 생리적 관류 (또한, 4 챔버 작업모드 관류로 공지됨)와 같이 본 기술분야에서 일상적인 것이다 (참조: 예를 들어, 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). 간략하면, 랑겐도르프 관류를 위해서는 대동맥을 카놀라 삽입하고, 세포봉괴 매질을 함유하는 저장소에 부착시킨다. 세포봉괴 매질은 예를 들어, 주입 또는 롤러 펌프에 의해서 송달되는 일정한 유속으로, 또는 일정한 정수압에 의해서, 대동맥 아래로 역방향으로 송달될 수 있다. 두 가지 경우 모두에서, 대동맥관은 강제로 닫히고, 관류액은 관상동맥구 내로 유도되며 (이에 의해서 심장의 전체 심실질량을 관류시킨다), 그 다음에 관상정맥동을 통해서 우심방 내로 흘러간다. 작업모드 관류를 위해서, 제 2 카놀라를 좌심방에 연결하고, 관류는 역행성으로부터 진행성으로 변화될 수 있다.

[0021] 다른 기관 또는 조직을 관류하는 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다. 예를 들어, 이하의 참고문헌들은 폐, 간, 신장, 뇌 및 사지의 관류를 기술하고 있다: 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.

[0022] 하나 또는 그 이상의 세포봉괴 매질을 사용하여 기관 또는 조직을 세포제거할 수 있다. 세포봉괴 매질은 일반적으로 SDS, PEG 또는 트리톤 X와 같은 적어도 하나의 세제를 포함한다. 세포봉괴 매질은 물을 포함하여 매질이 세포와 삼투적으로 비상화성이될 수 있다. 대신으로, 세포봉괴 매질은 세포와의 삼투적 상화성을 위해서 완충제 (예를 들어, PBS)를 포함할 수 있다. 세포봉괴 매질은 또한, 하나 또는 그 이상의 콜라게나제, 하나 또는 그 이상의 디스파제, 하나 또는 그 이상의 DNases, 또는 트립신과 같은 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 프로테아제와 같은 효소를 포함할 수 있다. 일부의 경우에, 세포봉괴 매질은 또한, 또는 대신으로 하나 또는 그 이상의 효소의 억제제 (예를 들어, 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제, 및/또는 콜라게나제 억제제)를 포함할 수 있다.

[0023] 특정의 구체예에서, 카놀라 삽입된 기관 또는 조직은 두 개의 상이한 세포봉괴 매질에 의해서 순차적으로 관류될 수 있다. 예를 들어, 제 1 세포봉괴 매질은 SDS와 같은 음이온성 세제를 포함할 수 있고, 제 2 세포봉괴 매질은 트리톤 X와 같은 이온성 세제를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 세포봉괴 매질로 관류시키는데 이어서, 카놀라 삽입된 기관 또는 조직은 예를 들어, 세척용액 및/또는 본 명세서에 기술된 것과 같은 하나 또는 그 이상의 효소를 함유하는 용액으로 관류될 수 있다.

[0024] 관류의 방향 (예를 들어, 진행성 및 역행성)을 교대로 하는 것은 전체 기관 또는 조직을 효과적으로 세포제거하는 것을 도와줄 수 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포제거는 본질적으로 기관을 내부에서부터 세포제거하여 ECM에 거의 손상을 야기하지 않는다. 기관 또는 조직은 4 내지 40℃ 사이의 적합한 온도에서 세포제거될 수 있다. 기관 또는 조직의 크기 및 중량 및 세포봉괴 매질 내의 특정한 세제(들) 및 세제(들)의 농도에 따라서, 기관 또는 조직은 일반적으로 고형 기관 또는 조직의 그램당, 약 2 내지 약 12 시간 동안 세포봉괴 매질로 관류시킨다. 세척액을 포함하는 기관은 조직의 그램당, 약 12 내지 약 12 시간 동안 관류될 수 있다. 관류는 일반적으로 박동성 혈류, 유속 및 압력을 포함하는 생리학적 조건으로 조정된다,

[0025] 본 명세서에서 나타낸 바와 같이, 세포제거된 기관 또는 조직은 본질적으로, 혈관 수상구조 (vascular tree)의 세포외 매트릭스 (ECM) 성분을 포함한 기관 또는 조직의 전부 또는 대부분의 부분의 ECM 성분으로 구성된다. ECM 성분은 다음의 성분들 중의 어느 것이나, 또는 전부를 포함할 수 있다: 기저막과 같은 규정된 구조로 조직화되어 유지시킬 수 있는 피브로넥틴, 피브릴린, 라미닌, 엘라스틴, 콜라겐 군의 구성원 (예를 들어, 콜라겐 I, III 및 IV), 글리코사미노글리칸, 분쇄된 물질, 망상섬유 및 트롬보스폰딘. 성공적인 세포제거는 표준 조직학적 염색방법을 사용하여 조직학적 절편 내에서 검출가능한 근필라멘트, 내피세포, 평활근 세포, 및 핵이 존재하

지 않는 것으로 정의된다. 반드시 는 아니지만 바람직하게는, 잔류하는 세포 파편도 또한 세포제거된 기관 또는 조직으로부터 제거된다.

[0026] 기관 또는 조직을 효과적으로 재세포화 및 생성시키기 위해서는, ECM의 형태학 및 구성이 세포제거의 과정 중에 및 그 후에 유지되는 (즉, 실질적으로 온전하게 보존하는) 것이 중요하다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 "형태학"은 ECM의 기관 또는 조직의 전반적인 형상을 나타내는 한편, 본 명세서에서 사용된 것으로서 "구성"은 외부 표면, 내부 표면, 및 이들 사이의 ECM을 나타낸다.

[0027] ECM의 형태학 및 구성은 시각적으로 및/또는 조직학적으로 검사될 수 있다. 예를 들어, 고정 기관의 외부 표면 상의, 또는 기관 또는 조직의 혈관계 내의 기저막은 세포제거에 의해서 제거되거나 크게 손상되지 않아야 한다. 또한, ECM의 원섬유는 세포제거되지 않은 기관 또는 조직의 원섬유와 유사거나, 또는 그로부터 크게 변화되지 않은 것이어야 한다.

[0028] 하나 또는 그 이상의 화합물을 세포제거된 기관 또는 조직 내에 또는 그 위에 적용하여 예를 들어, 세포제거된 기관을 보존하거나, 재세포화를 위한 세포제거된 기관 또는 조직을 제조하고/제조하거나, 재세포화 과정 중에 세포를 도와주거나 자극할 수 있다. 이러한 화합물에는 하나 또는 그 이상의 성장인자 (예를 들어, VEGF, DKK-1, FGF, BMP-1, BMP-4, SDF-1, IGF 및 HGF), 면역조절제 (예를 들어, 사이토킨, 글루코코르티코이드, IL2R 길항제, 류코트리엔 길항제), 및/또는 응고 캐스케이드 (cascade)를 변형시키는 인자 (예를 들어, 아스피린, 헤파린-결합 단백질, 및 헤파린)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, 세포제거된 기관 또는 조직은 예를 들어, 방사선조사 (예를 들어, UV, 감마)에 의해서 더 처리하여 세포제거된 기관 또는 조직 상에 또는 그 안에 잔류하는 어떤 유형의 미생물의 존재라도 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0029] 기관 또는 조직의 재세포화

[0030] 본 발명은 기관 또는 조직을 생성시키는 물질 및 방법을 제공한다. 기관 또는 조직은 본 명세서에 기술된 바와 같은 세포제거된 기관 또는 조직을 재생성 세포의 집단과 접촉시킴으로써 생성될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것으로서 재생성 세포는 세포제거된 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해서 사용된 모든 세포이다. 재생성 세포는 전능세포, 만능세포 (pluripotent cells), 또는 다능세포 (multipotent cells)일 수 있으며, 비수입되거나 수입될 수 있다. 재생성 세포는 또한, 단일-계통 세포 (single-lineage cells)일 수도 있다. 또한, 재생성 세포는 비분화된 세포, 부분적으로 분화된 세포, 또는 완전히 분화된 세포일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 재생성 세포는 배아줄기세포 (미국 국립보건원 (NIH)에 의해서 규정된 바와 같음; 참조예: 월드 와이드 웹 (World Wide Web) 상의 stemcells.nih.gov에서 용어사전)가 포함된다. 재생성 세포에는 또한 선조세포, 전구세포, 및 제대세포 및 태아줄기세포를 포함하는 "성체"-유래 줄기세포가 포함된다.

[0031] 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해서 사용될 수 있는 재생성 세포의 예로는 배아줄기세포, 제대혈 세포, 조직-유래 줄기 또는 선조세포, 골수-유래 줄기 또는 선조세포, 혈액-유래 줄기 또는 선조세포, 중간엽 줄기세포 (MSC), 골격근-유래 세포, 또는 다능성 성체 선조세포 (MAPC)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 사용될 수 있는 추가의 재생성 세포에는 심장줄기세포 (CSC), 다능성 성체 심장-유래 줄기세포, 심장 섬유아세포, 심장 미세혈관계 세포 또는 대동맥 내피세포가 포함된다. 골수 단핵세포 (BM-MNC)와 같은 골수-유래 줄기세포, 내피 또는 혈관 줄기 또는 선조세포, 및 내피 선조세포 (EPC)와 같은 말초혈액-유래 줄기세포가 또한 재생성 세포로 사용될 수도 있다.

[0032] 기관 또는 조직을 생성시키기 위해서 세포제거된 기관 내에 및 그 상에 도입되는 재생성 세포의 수는 기관 (예를 들어, 어떤 기관인지, 및 그 기관의 크기 및 중량) 또는 조직 및 재생성 세포의 유형 및 발육단계 모두에 따라서 좌우된다. 상이한 유형의 세포는 이들 세포가 도달하는 개체군 밀도 (population density)에 관하여 상이한 경향을 가질 수 있다. 마찬가지로, 상이한 기관 또는 조직은 상이한 밀도로 세포화될 수 있다. 예를 들어, 세포제거된 기관 또는 조직은 적어도 약 1,000 개 (예를 들어, 적어도 10,000, 100,000, 1,000,000, 10,000,000 또는 100,000,000 개)의 재생성 세포로 "접종"될 수 있거나; 또는 그에 부착된 약 1,000 세포/조직 mg (습윤 중량, 즉 세포제거 전의 중량) 내지 약 10,000,000 세포/조직 mg (습윤 중량)을 가질 수 있다.

[0033] 재생성 세포는 하나 또는 그 이상의 위치에 주입함으로써 세포제거된 기관 또는 조직 내로 도입 ("접종")될 수 있다. 또한, 한가지 유형 이상의 세포 (즉, 세포의 각테일)를 세포제거된 기관 또는 조직에 도입시킬 수도 있다. 예를 들어, 세포의 각테일을 세포제거된 기관 또는 조직 내의 다수의 위치에 주입할 수 있거나, 상이한 세포 유형을 세포제거된 기관 또는 조직의 상이한 부분 내에 주입할 수 있다. 주입하는 대신에, 또는 주입하는 이외에도, 재생성 세포 또는 세포의 각테일은 카놀라 삽입된 세포제거된 기관 또는 조직 내에 관류시킴으로써

도입될 수 있다. 예를 들어, 재생성 세포는 관류매질을 사용하여 세포제거된 기관 내로 관류시킬 수 있으며, 그 다음에 팽창 및/또는 분화매질로 교환하여 재생성 세포의 성장 및/또는 분화를 유도할 수 있다.

[0034] 재세포화 중에, 기관 또는 조직은 적어도 일부의 재생성 세포가 세포제거된 기관 또는 조직 내에서, 또는 그 위에서 증식 및/또는 분화할 수 있는 조건 하에서 유지된다. 이들 조건에는 적절한 온도 및/또는 압력, 전기적 및/또는 기계적 활성화, 힘, 적절한 양의 O_2 및/또는 CO_2 , 적절한 양의 습도, 멸균 또는 거의-멸균 조건이 포함된다. 재세포화 중에, 세포제거된 기관 또는 조직 및 그에 부착된 재생성 세포는 적합한 환경에서 유지된다. 예를 들어, 재생성 세포는 영양적 보충물 (예를 들어, 영양소 및/또는 글루코스와 같은 탄소 공급원), 외인성 호르몬 또는 성장인자, 및/또는 특정한 pH를 필요로 할 수 있다.

[0035] 재생성 세포는 세포제거된 기관 또는 조직에 대해서 동종성 (예를 들어, 인간 재생성 세포로 접종된 인간 세포제거된 기관 또는 조직)일 수 있거나, 재생성세포는 세포제거된 기관 또는 조직에 대해서 이종성 (예를 들어, 인간 재생성 세포로 접종된 돼지 세포제거된 기관 또는 조직)일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "동종성 (alloegenic)"은 기관 또는 조직이 유래하는 것과 동일한 종 (예를 들어, 관련이 있거나 없는 개체)으로부터 수득된 세포를 나타내는 반면에, 본 명세서에서 사용된 것으로서 "이종성 (xenogeneic)"은 기관 또는 조직이 유래하는 것과는 상이한 종으로부터 수득된 세포를 나타낸다.

[0036] 일부의 구체예에서, 본 명세서에 기술된 방법에 의해서 생성된 기관 또는 조직은 환자에게 이식되는 것이다. 이들 경우에, 세포제거된 기관 또는 조직을 재세포화시키기 위해서 사용된 재생성 세포는 환자로부터 수득될 수 있어서 재생성 세포는 환자에 대해서 "자가유래"성일 수 있다. 환자로부터의 재생성 세포는 본 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여 예를 들어, 생존의 다양한 단계에 있는 (예를 들어, 출생전에, 신생아 또는 주산기에, 청년기 중에, 또는 성체로서) 혈액, 골수, 조직 또는 기관으로부터 수득될 수 있다. 대신으로, 세포제거된 기관 또는 조직을 재세포화하기 위해서 사용된 재생성 세포는 환자에 대해서 공통 유전자형 (syngeneic) (예를 들어, 일란성 쌍둥이로부터)일 수 있거나, 재생성 세포는 예를 들어, 환자의 친족 또는 환자와 관련이 없는 HLA-매치된 개체로부터의 인간 림프구 항원 (HLA)-매치된 세포일 수 있거나, 재생성 세포는 예를 들어, 비-HLA-매치된 공여체로부터 환자에 대해서 동종성일 수 있다.

[0037] 재생성 세포의 공급원과는 관계없이 (예를 들어, 자가유래성인지 아닌지), 세포제거된 고품 기관은 환자에 대해서 자가유래성이거나, 동종성이거나, 이종성일 수 있다.

[0038] 특정의 경우에, 세포제거된 기관은 생체내에서 세포로 재세포화될 수 있다 (예를 들어, 기관 또는 조직을 개체에게 이식한 후에). 생체내 재세포화는 예를 들어, 본 명세서에 기술된 재생성 세포 중의 어떤 것에 의해서도 상술한 바와 같이 (예를 들어, 주입 및/또는 관류) 수행될 수 있다. 대신으로 또는 추가로, 세포제거된 기관 또는 조직의 내인성 세포에 의한 생체내 접종은 천연적으로 일어날 수 있거나, 재세포화된 조직에 송달된 인자들에 의해서 매개될 수 있다.

[0039] 재생성 세포의 진행은 재세포화 중에 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 기관 또는 조직 상의 또는 그 내의 세포의 수는 재세포화 중의 하나 또는 그 이상의 시점에서 조직생검을 수행함으로써 평가될 수 있다. 또한, 재생성 세포가 겪는 분화의 양은 세포 또는 세포의 집단에 다양한 마커 (marker)가 존재하는지 아닌지를 측정함으로써 모니터링될 수 있다. 상이한 세포 유형 및 이들 세포 유형에 대한 분화의 상이한 단계와 연관된 마커는 본 기술분야에서 공지되어 있으며, 항체 및 표준 면역학적 검정법을 사용하여 쉽게 검출될 수 있다 (참조: 예를 들어, *Current Protocols in Immunology*, 2005, Coligan et al., Eds., John Wiley & Sons, Chapters 3 and 11). 핵산 검정법뿐만 아니라 형태학적 및/또는 조직학적 평가를 사용하여 재세포화를 모니터링할 수 있다.

[0040] **기관 또는 조직을 세포제거 및/또는 재세포화하기 위한 제어 시스템**

[0041] 본 발명은 또한, 기관 또는 조직을 세포제거 및/또는 재세포화하기 위한 시스템 (예를 들어, 생물반응기 (bioreactor))를 제공한다. 이러한 시스템은 일반적으로 기관 또는 조직에 카놀라를 삽입하기 위한 적어도 하나의 카놀라 삽입장치, 카놀라(들)를 통해서 기관 또는 조직을 관류시키기 위한 관류기구, 및 기관 또는 조직에 대한 멸균 환경을 유지시키기 위한 수단 (예를 들어, 봉쇄 시스템 (containment system))을 포함한다. 카놀라 삽입 및 관류는 본 기술분야에서 잘 알려진 기술이다. 카놀라 삽입장치는 일반적으로 기관 또는 조직의 혈관, 도관 및/또는 공동 내로 도입시키기 위한 크기-적합성 (size-appropriate) 중공 배관을 포함한다. 일반적으로, 하나 또는 그 이상의 혈관, 도관 및/또는 공동이 기관 내에서 카놀라 삽입된다. 관류기구는 액체 (예를 들어, 세포봉괴 매질)를 위한 보유용기 및 하나 또는 그 이상의 카놀라에 의해서 기관을 통해 액체를 이동시키기 위한 기전 (예를 들어, 펌프, 공기압, 중력)을 포함할 수 있다. 세포제거 및/또는 재세포화 중의 기관 또는 조직의

멸균성은 기류를 조절 및 여과하고/하거나 예를 들어, 원치 않는 미생물의 성장을 예방하기 위한 항생제, 항진균제 또는 그 밖의 다른 항미생물제를 관류시키는 것과 같은 본 기술분야에서 공지된 다양한 기술을 사용하여 유지될 수 있다.

[0042] 본 명세서에 기술된 바와 같이 기관 또는 조직을 세포제거 및 재세포화하기 위한 시스템은 특정의 관류 특징 (예를 들어, 압력, 용적, 유동 패턴, 온도, 가스, pH), 기계적 힘 (예를 들어, 심실벽 운동 및 스트레스), 및 전기적 자극 (예를 들어, 페이스팅 (pacing))을 모니터링하는 능력을 가질 수 있다. 관상혈관상은 세포제거 및 재세포화의 과정을 거쳐서 변화기 때문에 (예를 들어, 혈관 저항성, 용적), 큰 변동을 피하기 위해서는 압력-조절된 관류기구가 유리하다. 관류의 유효성은 유출물 및 조직 절편에서 평가될 수 있다. 관류 용적, 유동 패턴, 온도, O_2 및 CO_2 분압, 및 pH는 표준방법을 사용하여 모니터링될 수 있다.

[0043] 센서 (sensor)를 사용하여 시스템 (예를 들어, 생물반응기) 및/또는 기관 또는 조직을 모니터링할 수 있다. 소노마이크로메트리 (sonomicrometry), 마이크로마노메트리 (micromanometry) 및/또는 전도율 측정을 사용하여 심근벽 운동 및 성능에 관한 압력-용적 또는 전부하 동원성 작업박출량 (preload recruitable stroke work) 정보를 획득할 수 있다. 예를 들어, 센서를 사용하여 카놀라 삽입된 기관 또는 조직을 통해서 이동하는 액체의 압력; 시스템 내의 주위온도 및/또는 기관 또는 조직의 온도; 카놀라 삽입된 기관 또는 조직을 통해서 이동하는 액체의 pH 및/또는 유속; 및/또는 재세포성 기관 또는 조직의 생물학적 활성을 모니터링할 수 있다. 이러한 특징을 모니터링하기 위한 센서를 갖는 이외에도, 기관 또는 조직을 세포제거 및/또는 재세포화하기 위한 시스템은 또한, 이러한 특징을 유지 또는 조정하는 수단을 포함할 수 있다. 이러한 특징을 유지 또는 조정하는 수단은 온도계, 온도조절장치 (thermostat), 전극, 압력 센서, 오버플로우 밸브 (overflow valve), 액체의 유속을 변화시키기 위한 밸브, 용액의 pH를 변화시키기 위해서 사용된 용액에 대한 유체 연결부를 개폐시키기 위한 밸브, 풍선, 외부 페이스마커 (pacemaker), 및/또는 순응챔버 (compliance chamber)와 같은 성분을 포함할 수 있다. 안정한 조건 (예를 들어, 온도)이 보장되는 것을 돕기 위하여 챔버, 저장소 및 배관은 수-자켓화 (water-jacketed)될 수 있다.

[0044] 재세포화 중에는 기관 및 그에 부착된 세포 상에 기계적 부하를 제공하는 것이 유리할 수 있다. 예로서, 좌심방을 통해서 좌심실 내로 삽입된 풍선을 사용하여 심장에 기계적 스트레스를 제공할 수 있다. 용적 및 속도의 조정을 허용하는 피스톤 펌프를 풍선에 연결시켜 좌심실벽 운동 및 스트레스를 모사할 수 있다. 벽 운동 및 스트레스를 모니터링하기 위하여, 좌심실벽 운동 및 압력은 마이크로마노메트리 및/또는 소노마이크로메트리를 사용하여 측정될 수 있다. 일부의 구체예에서는, 외부 페이스마커를 피스톤 펌프에 연결시켜 심실 풍선의 각각의 배기 (수축기와 동등함)과 동조화된 자극을 제공할 수 있다. 말초 ECG를 심장 표면으로부터 기록하여 페이스팅 전압의 조정, 탈- 및 재분극의 모니터링을 허용하고, 재세포화 또는 재세포화된 심장의 단순화된 표면 지도를 제공할 수 있다.

[0045] 기계적 심실 확장은 또한, 좌심방을 통해서 좌심실 내로 삽입된 카놀라에 연동펌프를 부착시킴으로써 달성될 수 있다. 풍선을 수반하는 상술한 방법과 유사하게, 카놀라를 통한 주기적인 유체 이동 (예를 들어, 박동성 유동)에 의해서 달성된 심실 확장은 전기적 자극과 동시에 일어날 수 있다.

[0046] 상술한 방법 및 물질을 사용하여, 포유동물 심장은 세포제거되고 재세포화될 수 있으며, 적절한 조건 하에서 유지되는 경우에, 수축기능을 겪고 페이스팅 자극 및/또는 약물학적 약제에 반응하는 기능적 심장이 생성될 수 있다. 이러한 재세포화된 기능적 심장은 포유동물에 이식되어 장기간 동안 기능을 수행할 수 있다.

[0047] 도 2는 기관 또는 조직을 세포제거 및/또는 재세포화시키기 위한 시스템 (예를 들어, 생물반응기)의 한가지 구체예를 나타낸다. 제시된 구체예는 심장을 세포제거하고 재세포화시키기 위한 생물반응기이다. 이 구체예는 조정가능한 속도 및 용적의 연동펌프 (A); 심실내 풍선에 연결된 조정가능한 속도 및 용적의 피스톤 펌프 (B); 조정가능한 전압, 진동 및 진폭의 외부 페이스마커 (C); ECG 기록기 (D); '동맥 라인' 내의 압력 센서 (관상동맥 압력에 해당함) (E); '정맥' 라인 내의 압력 센서 (관상정맥동 압력에 해당함) (F); 및 페이스마커와 피스톤 펌프 사이의 동조화 (G)를 갖는다.

[0048] 기관 또는 조직을 생성시키기 위한 시스템은 프로그래밍 가능한 프로세서 (programmable processor)와 함께 컴퓨터-관독가능한 저장매체에 의해서 제어될 수 있다 (즉, 본 명세서에서 사용된 것으로서 컴퓨터-관독가능한 저장매체는 프로그래밍 가능한 프로세서가 특정의 단계를 수행하도록 하기 위하여 그 위에 저장된 명령을 갖는다). 예를 들어, 프로그래밍 가능한 프로세서와 함께 이러한 저장매체는 하나 또는 그 이상의 센서로부터 정보를 받아서 저장할 수 있다. 프로그래밍 가능한 프로세서와 함께 이러한 저장매체는 또한, 정보 및 명령을 생물

반응기 및/또는 기관 또는 조직에 역으로 전달할 수도 있다.

[0049] 재세포화를 겪고 있는 기관 또는 조직은 생물학적 활성화에 대해서 모니터될 수 있다. 생물학적 활성화는 기관 또는 조직의 전기적 활성화, 기계적 활성화, 수축성, 및/또는 벽 스트레스와 같은 기관 또는 조직 그 자체의 생물학적 활성화일 수 있다. 또한, 기관 또는 조직에 부착된 세포의 생물학적 활성화는 예를 들어, 이온 수송/교환 활성화, 세포 분열, 및/또는 세포 생존도에 대해서 모니터될 수 있다 (참조: 예를 들어, *Laboratory Textbook of Anatomy and Physiology* (2001, Wood, Prentice Hall) 및 *Current Protocols in Cell Biology* (2001, Bonifacino et al., Eds, John Wiley & Sons)). 상기 거론한 바와 같이, 이것은 재세포화 중에 기관 상에서 능동 부하 (active load)를 모사하는데 유용할 수 있다. 프로그래밍 가능한 프로세서와 함께, 본 발명의 컴퓨터-관독가능한 저장매체를 사용하여 기관 또는 조직 상의 능동 부하를 모니터하고 유지시키는데 필요한 성분들을 조정할 수 있다.

[0050] 한가지 구체예에서, 기관 또는 조직의 중량은 프로그래밍 가능한 프로세서와 함께 특정한 해당 기관 또는 조직에 대한 노출시간 및 관류 압력을 계산할 수 있는 컴퓨터-관독가능한 저장매체에 입력할 수 있다. 이러한 저장매체는 전부하 및 후부하 (각각 관류 전 및 후의 압력) 및 유속을 기록할 수 있다. 이러한 구체예에서, 예를 들어, 프로그래밍 가능한 프로세서와 함께 컴퓨터-관독가능한 저장매체는 관류압력, 관류의 방향, 및/또는 하나 또는 그 이상의 펌프 및/또는 밸브 조절을 통한 관류 용액의 유형을 조정할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따라 본 기술분야의 숙련된 기술 내에서 통상적인 분자생물학, 미생물학, 생화학 및 세포생물학 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 상세히 설명된다. 본 발명은 특허청구범위에 기술된 발명의 범위를 제한하지 않는 이하의 실시예에 의해서 더 설명될 것이다.

[0052] <실시예>

[0053] 항목 A. 세포제거 (제I부)

[0054] 실시예 1 - 세포제거를 위한 고형 기관의 제조

[0055] 사후 혈전의 형성을 피하기 위해서, 공여체 랫트를 공여체의 kg당 400 U의 헤파린으로 전신적으로 헤파린 처리하였다. 헤파린 처리한 후에, 심장과 인접한 큰 혈관들을 조심스럽게 분리하였다.

[0056] 심장을 헤파린 (2000 U/ml)을 함유하는 생리적 식염수 (0.9%) 중에 넣고, 더 처리할 때까지 5°C에서 유지시켰다. 멸균조건 하에서, 결합조직을 심장 및 큰 혈관으로부터 분리하였다. 하대정맥 및 좌 및 우 폐정맥을 단섬유, 비-흡수성 결찰사 (monofil, non-resorbable ligatures)를 사용하여 우 및 좌심방으로부터 원위에서 결찰하였다.

[0057] 실시예 2 - 고형 기관의 카놀라 삽입 및 관류

[0058] 심장을 관류를 위해서 세포제거기구 상에 올려놓았다 (도 1). 하행 흉동맥을 카놀라 삽입하여 역행성 관상동맥 관류가 이루어지도록 하였다 (도 1, 카놀라 A). 흉동맥의 가지 (예를 들어, 완두동맥간, 좌총경동맥, 좌쇄골하동맥)를 결찰시켰다. 폐동맥은 그의 좌 및 우 폐동맥으로의 분기점의 앞에서 카놀라 삽입을 하였다 (도 1, 카놀라 B). 상대정맥을 카놀라 삽입하였다 (도 1, 카놀라 C). 이 배열은 역행성 및 진행성 관상동맥 관류 둘 다를 가능하게 한다.

[0059] 양압이 대동맥 카놀라 (A)에 적용되는 경우에, 관류는 모세혈관상을 통해서 관상동맥으로부터 우심방에 대한 관상정맥 시스템 및 상대정맥 (C)쪽으로 나타났다. 양압이 상대정맥 카놀라에 적용되는 경우에, 관류는 모세혈관상을 통해서 우심방, 관상정맥동 및 관상정맥으로부터 관상동맥 및 대동맥 카놀라 (A)쪽으로 나타났다.

[0060] 실시예 3 - 세포제거

[0061] 심장을 세포제거기구 상에 올려놓은 후에, 진행성 관류는 관류액의 L당 1-5 mmol 아데노신을 함유하는 헤파린 처리되고 칼슘을 함유하지 않는 냉포스페이트 완충 용액을 사용하여 시작하여 일정한 관상동맥 혈류를 재건시켰다. 관상동맥 혈류는 관상동맥 관류압력 및 유량을 측정하고, 관상동맥 저항을 계산함으로써 평가되었다. 15분의 안정한 관상동맥 혈류 후에, 세제-기본 세포제거공정을 시작하였다.

[0062] 이 절차의 상세한 사항은 이하에 기술된다. 그러나, 간략하면, 심장을 세제에 의해서 진행적으로 관류시켰다. 관류시킨 후에, 심장을 완충액 (예를 들어, PBS)에 의해서 역행적으로 씻어내었다. 그 후, 심장을 항생제를 함유하는 PBS 및 그에 이어서 DNase I을 함유하는 PBS로 관류시켰다. 그 후, 미생물 오염을 감소시키고 미래의 미생물 오염을 방지하기 위해서 심장을 1% 벤잘코늄 클로라이드로 관류시킨 다음에, PBS로 관류시켜 잔류하는

모든 세포성 성분, 효소, 또는 세제를 기관으로부터 세척하였다.

[0063] 실시예 4 - 사체 랫트 심장의 세포제거

[0064] 심장을 8 마리의 수컷 누드 랫트 (250-300 g)로부터 분리시켰다. 절제한 직후에, 대동맥궁을 카놀라 삽입하고, 심장을 지시된 세제에 의해서 역행적으로 관류시켰다. 4 개의 상이한 세제-기본 세포제거 프로토콜 (이하 참조)을 (a) 세포성 성분을 제거하고, (b) 혈관구조를 보존하는데 있어서의 그들의 실행가능성 및 효능에 관하여 비교하였다.

[0065] 세포제거는 일반적으로 다음의 단계들을 포함하였다: 고형 기관의 안정화, 고형 기관의 세포제거, 고형 기관의 복원 및/또는 중화, 고형 기관의 세척, 기관 상에 잔류하는 모든 DNA의 분해, 기관의 소독, 및 기관의 항상성.

[0066] A) 세포제거 프로토콜 #1 (PEG)

[0067] 심장을 100 U/ml 페니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 µg/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS로 재순환이 없이 세척하였다. 그 후, 심장을 35 ml 폴리에틸렌글리콜 (PEG; 1 g/ml)로 수동으로 재순환시키면서 30분까지 동안 세포제거하였다. 그 후, 기관을 재순환용 펌프를 사용하여 500 ml PBS로 24 시간까지 동안 세척하였다. 세척단계는 매회 적어도 24 시간 동안 적어도 2 회 반복하였다. 심장은 수동으로 재순환시키면서 적어도 1 시간 동안 35 ml DNase I (70 U/ml)에 노출시켰다. 기관을 다시 500 ml PBS로 적어도 24 시간 동안 세척하였다.

[0068] B) 세포제거 프로토콜 #2 (트리톤 X 및 트립신)

[0069] 심장을 100 U/ml 페니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 µg/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS로 재순환이 없이 적어도 약 20 분 동안 세척하였다. 그 후, 심장을 0.05% 트립신으로 30분 동안 세포제거하고 이어서 5% 트리톤-X 및 0.1% 암모늄-하이드록사이드를 함유하는 500 ml PBS로 약 6 시간 동안 관류시켰다. 심장을 탈이온수로 약 1 시간 동안 관류시킨 다음에, PBS로 12 시간 동안 관류시켰다. 그 후, 심장을 재순환용 펌프를 사용하여 500 ml PBS로 매회 24 시간 동안씩 3 회 세척하였다. 심장은 수동으로 재순환시키면서 1 시간 동안 35 ml DNase I (70 U/ml)로 관류시키고, 재순환용 펌프를 사용하여 500 ml PBS로 매회 적어도 24 시간 동안씩 2 회 세척하였다.

[0070] C) 세포제거 프로토콜 #3 (1% SDS)

[0071] 심장을 100 U/ml 페니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 µg/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS로 재순환이 없이 적어도 약 20 분 동안 세척하였다. 심장을 재순환용 펌프를 사용하여 1% SDS를 함유하는 500 ml 물로 적어도 약 6 시간 동안 관류시켰다. 그 후, 심장을 탈이온수로 약 1 시간 동안 세척하고, PBS로 약 12 시간 동안 세척하였다. 심장을 재순환용 펌프를 사용하여 500 ml PBS로 매회 적어도 약 24 시간 동안씩 3 회 세척하였다. 그 후, 심장은 수동적 재순환을 사용하여 약 1 시간 동안 35 ml DNase I (70 U/ml)로 관류시키고, 재순환용 펌프를 사용하여 500 ml PBS로 매회 적어도 24 시간 동안씩 3 회 세척하였다.

[0072] D) 세포제거 프로토콜 #4 (트리톤 X)

[0073] 심장을 100 U/ml 페니실린, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신, 및 0.25 µg/ml 암포테리신 B를 함유하는 200 ml PBS로 재순환이 없이 적어도 약 20 분 동안 세척하였다. 그 후, 심장을 재순환용 펌프를 사용하여 5% 트리톤 X 및 0.1% 암모늄 하이드록사이드를 함유하는 500 ml 물에 의해서 적어도 6 시간 동안 세포제거하였다. 그 후, 심장을 탈이온수로 약 1 시간 동안 관류시킨 다음에, PBS로 약 12 시간 동안 관류시켰다. 심장을 재순환용 펌프를 사용하여 500 ml PBS로 매회 적어도 24 시간 동안씩 3 회 관류시킴으로써 세척하였다. 그 후, 심장은 수동으로 재순환시키면서 약 1 시간 동안 35 ml DNase I (70 U/ml)로 관류시키고, 500 ml PBS로 매회 약 24 시간 동안씩 3 회 세척하였다.

[0074] 초기 실험을 위해서, 세포제거기구는 층류 후드 (laminar flow hood) 내에 설비하였다. 심장은 60 cm H₂O의 관상동맥 관류압력에서 관류시켰다. 비록 필요하지는 않지만, 상기 실험에서 기술된 심장을 세포제거 챔버 내에 배치하고, 가능한 한 다수의 세포성 성분 및 세제가 세척되도록 항생제를 함유하는 PBS에 의해서 5 ml/분의 연속류로서 재순환 모드로 72 시간 동안 완전히 침지 및 관류시켰다.

[0075] 성공적인 세포제거는 조직학적 절편 내에 근필라멘트 및 핵이 없는 것으로 정의되었다. 혈관구조의 성공적인 보존은 조직 절편을 매립하기 전에 2% 에반스 블루에 관류시킴으로써 평가되었다.

- [0076] 매우 효율적인 세포제거는, 심장을 우선 일정한 관상동맥 관류압력에서 탈이온화된 H₂O에 용해된 이온성 세제 (1% 나트륨-도데실-설페이트 (SDS), 약 0.03 M)에 의해서 진행적으로 관류시킨 다음에, 비이온성 세제 (1% 트리톤 X-100)에 의해서 진행적으로 관류시켜 SDS를 제거하고, 아마도 세포의 매트릭스 (ECM) 단백질을 복원시킨 경우에 일어났다. 간헐적으로, 심장을 포스페이트 완충된 용액으로 역행적으로 관류시켜 폐색된 모세혈관 및 작은 혈관들을 청정화시켰다.
- [0077] 실시예 5 - 세포제거 기관의 평가
- [0078] 세포제거 후의 온전한 혈관구조를 입증하기 위해서, 세포제거된 심장을 에반스 블루에 의한 랑겐도르프 관류를 통해서 염색하여 혈관 기저막을 염색하고, 대- 및 미세-혈관 밀도를 정량화한다. 더 나아가, 폴리스티렌 입자를 심장 내로, 및 심장을 통해서 관류시켜 관상동맥 용적, 혈관 누출의 수준을 정량하고, 관상동맥 유출물 및 조직 절편을 분석함으로써 관류의 분포를 평가할 수 있다. 다음 3 가지 기준의 조합을 평가하여 분리된 비-세포제거된 심장과 비교하였다: 1) 폴리스티렌 입자의 균등 분포 (even distribution), 2) 누출에 있어서의 어느 수준에서의 상당한 변화, 3) 미세혈관 밀도.
- [0079] 섬유 배향은 단축성 또는 이축성 스트레스를 받은 샘플에 대해서 실시간으로 적용될 수 있는 타워 (Tower) 등 (2002, Fiber alignment imaging during mechanical testing of soft tissues, *Ann Biomed Eng.*, 30(10):1221-33)의 편극 현미경 기술에 의해서 평가된다. 랑겐도르프 관류 중에, 세포제거된 ECM의 기본적인 기계적 특성을 기록하고 (순응성, 탄성, 파열압력 (burst pressure)), 새롭게 분리된 심장과 비교하였다.
- [0080] **항목 B. 세포제거 (제II부)**
- [0081] 실시예 1 - 랫트 심장의 세포제거
- [0082] 12 주령의 수컷 F344 피서 (Fischer) 랫트 (Harlan Labs, PO Box 29176 Indianapolis, IN 46229)를 100 mg/kg 케타민 (Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, MO) 및 10 mg/kg 자일라진 (Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, MO)을 복강내 주사를 사용하여 마취시켰다. 좌측 대퇴정맥을 통한 전신적 헤파린 처리 (American Pharmaceutical Partners, Inc., Schaumburg, IL) 후에, 정중흉골절개술 (median sternotomy)을 수행하고, 심막을 개방하였다. 흉골후 체지방 (retrosternal fat body)을 제거하고, 상행 흉대동맥을 절제하고, 그의 가치를 절찰하였다. 대정맥 및 폐정맥, 폐동맥 및 흉대동맥을 가로로 절개하고, 심장을 흉부로부터 분리하였다. 전충진된 1.8 mm 대동맥 카눌라 (Radnoti Glass, Monrovia, CA)를 상행 대동맥에 삽입하여 역행성 관상동맥 관류 (랑겐도르프)를 허용하였다. 심장을 10 μ M 아테노신을 함유하는 헤파린 처리된 PBS (Hyclone, Logan, UT)에 의해서 75 cm H₂O의 관상동맥 관류압력에서 15 분 동안 관류시키고, 이어서 탈이온수 중의 1% 나트륨 도데실 설페이트 (SDS) 또는 1% 폴리에틸렌 글리콜 1000 (PEG 1000) (EMD Biosciences, La Jolla, Germany) 또는 1% 트리톤-X 100 (Sigma, St. Louis, MO)으로 2-15 분 동안 관류시켰다. 이어서 15 분 동안의 탈이온수 관류 및 30 분 동안의 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (Sigma, St. Louis, MO)에 의한 관류를 수행하였다. 그 후, 심장을 항생제-함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (Gibco, Carlsbad, CA) 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (Sigma, St. Louis, MO))에 의해서 124 시간 동안 연속적으로 관류시켰다.
- [0083] 1% PEG, 1% 트리톤-X 100 또는 1% SDS에 의한 420 분의 역행적 관류 후에, PEG 및 트리톤-X 100 관류는 부종성의 불투명한 외관을 유도하였으며, SDS 관류는 불투명한 요소가 느리게 세척되었기 때문에 거의 반투명한 이식물을 제공하는 더욱 극적인 변화를 야기하였다. 3 가지 프로토콜 모두에 노출된 심장은 관류 프로토콜 (77.4 mmHg의 일정한 관상동맥 관류압력에서) 전체에 걸쳐서 관상동맥 파열 또는 대동맥판 기능부전의 증거가 없이 전체적으로 온전하게 유지되었다. 관상동맥 혈류는 관류의 처음 60 분 동안에 3 가지 프로토콜 모두에서 감소한 다음에, SDS 관류 중에서는 정상화되었고 트리톤-X 100 및 PEG 관류에서는 증가된 채로 유지되었다. SDS 관류가 계산된 관상동맥 저항 (250 mmHg.s.ml⁻¹ 이하)에서 최고의 초기 증가를 유도하였으며, 그 다음이 트리톤-X (200 mmHg.s.ml⁻¹ 이하) 및 PEG (150 mmHg.s.ml⁻¹ 이하)였다.
- [0084] 세제 관류된 심장조직의 조직학적 절편을 사용하여, 관찰된 기간에 걸친 세포제거가 PEG 및 트리톤-X 100 처리된 심장 둘 다에서는 불완전한 것으로 측정되었으며; 헤마톡실린-에오신 (H&E) 염색은 핵 및 형문 필라멘트를 나타내었다. 그와는 대조적으로, SDS-관류된 심장의 절편에서는 핵 또는 수축 필라멘트가 검출될 수 없었다. 그러나, 혈관구조 및 ECM 섬유 배향은 SDS-처리된 심장에서 보존되었다.
- [0085] 초기 세포제거 후에 ECM으로부터 이온성 SDS를 제거하기 위해서, 기관은 트리톤-X 100으로 30 분 동안 관류시켰

다. 추가로, 그리고 모든 세제의 완전한 세척을 보장하고 생리학적 pH를 재건시키기 위해서, 세포제거된 기관은 탈이온수 및 PBS로 124 시간 동안 광범하게 관류시켰다.

[0086] 실시예 2 - 랫트 신장의 세포제거

[0087] 신장 분리를 위해서는, 전체 복강 내용물을 젖은 거즈로 싸서 조심스럽게 옆으로 이동시켜 후복막 공간을 노출시켰다. 장간막 혈관을 결찰하고 가로로 절개하였다. 복부 대동맥을 결찰하고, 신장동맥의 출발점 아래에서 가로로 절개하였다. 흉대동맥을 횡경막 바로 위에서 가로로 절개하고, 1.8 mm 대동맥 카놀라 (Radnoti Glass, Monrovia, CA)를 사용하여 카놀라 삽입하였다. 신장을 조심스럽게 후복막강으로부터 분리시키고, 멸균 PBS (Hyclone, Logan, UT) 중에 침지시켜 신장동맥에 대한 인장력 (pulling force)을 최소화시켰다. 15 분 동안의 헤파린 처리된 PBS 관류에 이어서 2-16 시간 동안의 탈이온수 중의 1% SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의한 관류 및 30 분 동안의 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (Sigma, St. Louis, MO)에 의한 관류를 수행하였다. 그 후, 간을 항생제-함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (Gibco, Carlsbad, CA) 및 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (Sigma, St. Louis, MO))에 의해서 124 시간 동안 연속적으로 관류시켰다.

[0088] 420 분 동안의 SDS 관류에 이은 트리톤-X 100 관류는 온전한 혈관 및 기관 구성을 갖는 완전히 세포제거된 신장 ECM 골격을 제공하였다. 에반스 블루 관류는 세포제거된 심장 ECM과 유사한 온전한 혈관계를 확인하였다. 세포제거된 신장 피질의 모바트 펜타크롬 염색은 어떤 온전한 세포 또는 핵도 없이 온전한 사구체 및 근위 및 원위 굽상세관 기저막을 나타내었다. 세포제거된 신장 수질의 염색은 온전한 세관 및 집합관 기저막을 나타내었다. 세포제거된 신장 피질의 SEM은 온전한 사구체 및 세뇨관 기저막을 나타내었다. 사구체 내에서 주위의 근위 및 원위 세뇨관 및 사구체 모세관 기저막으로부터 사구체의 윤곽을 그리는 보우만 주머니 (Bowman's capsule)과 같은 특징적 구조를 보존하였다. 세포제거된 신장 수질의 SEM 영상은 유두부 (papilla)쪽으로 유도하는 온전한 집합관 기저막을 갖는 신우 내로 뻗어가는 온전한 수질 피라미드를 나타내었다. 따라서, 신장의 모든 주요한 초미세구조는 세포제거 후에 온전하였다.

[0089] 실시예 3 - 랫트 폐의 세포제거

[0090] 폐 (호흡관과 함께)를 흉부로부터 조심해서 분리하고, 멸균 PBS (Hyclone, Logan, UT) 중에 침지시켜 폐동맥에 대한 인장력을 최소화시켰다. 15 분 동안의 헤파린 처리된 PBS 관류에 이어서 2-12 시간 동안의 탈이온수 중의 1% SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의한 관류 및 15 분 동안의 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (Sigma, St. Louis, MO)에 의한 관류를 수행하였다. 그 후, 폐를 항생제-함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (Gibco, Carlsbad, CA), 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (Sigma, St. Louis, MO))에 의해서 124 시간 동안 연속적으로 관류시켰다.

[0091] 180 분 동안의 SDS 관류에 이은 트리톤-X 100 관류는 온전한 기도 및 혈관을 갖는 완전히 세포제거된 폐 ECM 골격을 제공하였다. 조직학적 절편의 모바트 펜타크롬 염색은 폐 내에서 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 주요 구조적 단백질 및 또한 프로테오글리칸과 같은 가용성 요소를 포함한 ECM 성분의 존재를 나타내었다. 그러나, 어떤 핵이나 온전한 세포도 보존되지 않았다. 기도는 주기판지로부터 종말 세기관지에서 호흡 세기관지, 폐포관 및 폐포까지 보존되었다. 폐동맥으로부터 아래로 모세관 수준 및 폐정맥까지의 혈관상은 온전하게 유지되었다. 세포제거된 폐의 SEM 현미경사진은 보유한 세포의 증거는 없이 보존된 기관지, 폐포 및 혈관 기저막을 나타내었다. 폐간질 내의 모세관의 밀집한 네트워크를 포함하여, 폐포간 충격 뿐만 아니라 충격 기저막에 대한 주요 구조적 지지체를 제공하는 탄성 및 망상 섬유 메쉬워크 (meshwork)는 온전하였다.

[0092] 세포제거된 호흡관의 SEM 현미경사진은 호흡상피가 없는 거친 내강 기저막 및 세포제거된 초자연골환을 갖는 온전한 ECM 구성을 나타내었다.

[0093] 실시예 4 - 랫트 간의 세포제거

[0094] 간 분리를 위해, 대정맥을 중앙 개복술 (median laparotomy)을 통해서 노출시키고, 절개하고, 마우스 대동맥 카놀라 (Radnoti Glass, Monrovia, CA)를 사용하여 카놀라 삽입하였다. 간 동맥 및 정맥 및 담관을 가로로 절개하고, 간을 복부로부터 조심스럽게 분리하여 멸균 PBS (Hyclone, Logan, UT) 중에 침지시켜 문맥에 대한 인장력을 최소화시켰다. 15 분 동안의 헤파린 처리된 PBS 관류에 이어서 2-12 시간 동안의 탈이온수 중의 1% SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의한 관류 및 15 분 동안의 탈이온수 중의 1% 트리톤-X (Sigma, St. Louis, MO)에 의한 관류를 수행하였다. 그 후, 간을 항생제-함유 PBS (100 U/ml 페니실린-G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml 스트렙토마이신 (Gibco, Carlsbad, CA), 0.25 μ g/ml 암포테리신 B (Sigma, St. Louis, MO))에 의해서

124 시간 동안 연속적으로 관류시켰다.

[0095] 120 분 동안의 SDS 관류에 이은 트리톤-X 100 관류는 완전하게 세포제거된 간을 생성시키는데 충분하였다. 세포제거된 간의 모바트 펜타크롬 염색은 중심정맥, 및 간동맥, 담관 및 문맥을 함유하는 문맥 공간을 갖는 특징적인 간 조직화의 유지를 나타내었다.

[0096] 실시예 5 - 세포제거된 기관을 평가하기 위해서 사용된 방법 및 물질

[0097] 조직학 및 면역형광법. 모바트 펜타크롬 염색은 제조사 (American Mastertech Scientific, Lodi, CA)의 설명서에 따라 파라핀 매립된 세포제거 조직에 대해서 수행되었다. 간략하면, 파라핀 제거된 슬라이드를 베르호프 탄성 염색 (Verhoeff's elastic stain)을 사용하여 염색하고, 세정하고, 2% 염화제2철 중에서 구별하고, 세정하고, 5% 티오설페이트 내에 배치하고, 세정하고, 3% 빙초산 내에서 차단하고, 1% 알시안 블루 용액 중에서 염색하고, 세정하고, 크로세인 스칼렛-산 폭신 (crocein scarlet-acid fuchsin) 중에서 염색하고, 세정하고, 1% 빙초산 중에 담그고, 5% 포스포텅스텐산 중에서 염색을 제거하고, 1% 빙초산 중에 담그고, 탈수시키고, 알콜성 사프론 용액 중에 배치하고, 탈수시키고, 슬라이드에 올려놓고 커버를 덮었다.

[0098] 면역형광 염색은 세포제거된 조직에 대해서 수행되었다. 항원 복구는 동결된 절편 (세포제거된 조직)에 대해서 가 아닌 파라핀-매립된 조직 (재세포화된 조직)에 대해서 다음과 같이 수행되었다: 파라핀 절편을 왁스를 제거하고, 각각 5 분 동안씩 크실렌으로 2 회 교체에 이은 순차적 알콜 구배 및 흐르는 찬 수돗물로 세정함으로써 재수화시켰다. 그 후, 슬라이드를 항원 복구용액 (2.94 g 트리나트륨 시트레이트, 22 ml의 0.2 M 염산 용액, 978 ml 초순수 물, 및 pH 6.0으로 조정됨) 내에 배치하고, 30 분 동안 끓였다. 흐르는 찬 수돗물로 10 분 동안 세정한 후에, 면역염색을 시작하였다. 동결된 절편은 염색하기 전에 실온에서 15 분 동안 1× PBS (Mediatech, Herndon, VA) 중의 4% 포름알데히드 (Electron Microspray Sciences, Hatfield, PA)로 고정시켰다. 슬라이드를 실온에서 30 분 동안, 1×PBS 중의 4% 소태자혈청 (FBS; Hyclone, Logan, UT)으로 차단하였다. 샘플을 희석된 일차 및 이차 항체 (Ab)와 함께 실온에서 1 시간 동안 순차적으로 배양하였다. 각각의 단계 사이에, 슬라이드를 1×PBS로 3 회 (매회 5-10 분) 세척하였다. 콜라겐 I (염소 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-8788), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 콜라겐 III (염소 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-2405), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 피브로넥틴 (염소 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-6953), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), 및 라미닌 (토끼 폴리클로날 IgG (Cat. No. sc-20142), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)에 대한 일차 Ab를 차단 완충액과 1:40의 희석도로 사용하였다. 이차 Ab의 소 안티-염소 IgG 피코에리틴 (Cat. No. sc-3747, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 및 소 안티-토끼 IgG 피코에리틴 (Cat. No. sc-3750, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)은 차단 완충액과 1:80의 희석도로 사용하였다. 슬라이드를 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)을 함유하는 경화 포매제 (hardening mounting medium) 내에서 커버 글래스 (Fisherbrand 22×60, Pittsburgh, PA)로 덮었다. 영상은 이미지프로 플러스 (ImagePro Plus) 4.5.1 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD)을 사용하는 니콘 에클립스 (Nikon Eclipse) TE200 도립현미경 (Fryer Co. Inc., Huntley, IL) 상에서 이미지프로 플러스 4.5.1 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD)을 사용하여 기록하였다.

[0099] 주사전자현미경 검사. 정상 및 세포제거된 조직을 0.1 M 카코딜레이트 완충액 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 중의 2.5% 글루타르알데히드 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)로 15 분 동안 관류 고정시켰다. 그 후, 조직을 15 분 동안 0.1 M 카코딜레이트 완충액 중에서 2 회 세정하였다. 후 고정 (post-fixation)은 1% 오스뮴 테트록사이드 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA)를 사용하여 60 분 동안 수행하였다. 그 후, 조직 샘플을 증가 농도의 EtOH (10 분 동안 50%, 10 분 동안 70% 2회, 10 분 동안 80%, 10 분 동안 95% 2 회, 10 분 동안 100% 2 회) 중에서 탈수시켰다. 그 후, 조직 샘플을 타우시미스 삼드리 (Tousinis Samdri)-780A (Tousimis, Rockville, MD) 중에서 임계점 건조시켰다. 코팅은 덴톤 (Denton) DV-502A 진공증발기 (Denton Vacuum, Moorestown, NJ) 내에서 30 초간의 금/팔라듐 스퍼터 (sputter) 코팅으로 수행하였다. 주사전자현미경 영상은 히다치 (Hitachi) S4700 전계방출 주사전자현미경 (Hitachi High Technologies America, Pleasantpn, CA)을 사용하여 찍었다.

[0100] 기계적 시험. 심근조직의 십자형 (crosses)은 랫트의 좌심실로부터 절단하여 중심 면적이 5 mm×5 mm가 되고, 십자형의 축이 심장의 원주 및 세로 방향으로 정렬되도록 하였다. 조직 십자형의 초기 두께는 마이크로미터로 측정하였으며, 조직 십자형의 중심에서 3.59±0.14 mm인 것으로 나타났다. 십자형은 또한, 세포제거된 랫트 좌심실 조직으로부터 동일한 배향으로 동일한 중심 면적 크기를 갖도록 절단되었다. 세포제거된 샘플의 초기 두

게는 $238.5 \pm 38.9 \mu\text{m}$ 였다. 또한, 혈관 및 심장 조직을 조작하는데 사용된 또 다른 조직 조작용 골격으로 피브린 겔의 기계적 특성을 시험하였다. 피브린 겔을 최종 농도를 6.6 mg 의 피브린/ mL 로 하여 십자형 성형물로 구조화하였다. 피브린 겔의 평균 두께는 $165.2 \pm 67.3 \mu\text{m}$ 였다. 모든 샘플을 클램프 (clamp)에 의해서 이축 기계적 시험장치 (Instron Corporation, Norwood, MA)에 부착시키고, PBS에 침지시키고, 40% 변형률까지 동등하게 이축으로 신장시켰다. 정적인 수동적 기계적 특성을 정확하게 조사하기 위하여, 샘플은 4% 변형률의 증가분으로 신장시키고, 각각의 변형률 값에서 적어도 60 초 동안 이완하도록 허용하였다. 힘은 힘값 (force value)을 특정 축 방향에서의 횡단면적 ($5 \text{ mm} \times$ 초기 두께)으로 표준화시킴으로써 공칭 응력으로 전환시켰다. 공칭 응력은 초기 길이에 의해서 표준화된 변위로 계산되었다. 두 개의 축 사이뿐만 아니라 샘플군들 사이의 데이터를 비교하기 위해서 접선계수 (tangential modulus)를 다음과 같이 계산하였다:

[0101] $[T(\varepsilon=40\% \text{ 변형률}) - T(\varepsilon=36\% \text{ 변형률})]/4\% \text{ 변형률}$

[0102] 여기에서 T는 공칭 응력이고, ε 는 공칭 변형률이다. 접선계수에 대한 값은 평균치를 구하였으며, 두 개의 축 (원주 및 세로) 사이뿐만 아니라 샘플군들 사이에서 비교하였다.

[0103] 실시예 6 - 세포제거된 기관의 생체적합성의 평가

[0104] 생체적합성을 평가하기 위해서, 1 cc의 표준 팽창매질 (이스코브 (Iscove)의 변형된 둘베코 배지 (Gibco, Carlsbad, CA), 10% 소태자혈청 (Hyclone, Logan, UT), 100 U/mL 페니실린-G (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/mL 스트렙토마이신 (Gibco, Carlsbad, CA), 2 mmol/L L-글루타민 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0.1 mmol/L 2-머캅토에탄올 (Gibco, Carlsbad, CA))에 현탁된 100,000 개의 마우스 배아줄기세포를 ECM 절편 상에, 및 특정한 성장인자 자극 또는 피더세포 (feeder cell) 지지체가 없는 대조 플레이트 상에 접종하였다. 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)을 $10 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 세포 배양배지에 첨가하여 세포 핵을 표지하고, 세포 부착 및 팽창의 정량화를 가능하게 하였다. 영상은 니콘 에클립스 TE200 도립현미경 (Fryer Co. Inc., Huntley, IL) 상에서 이미지프로 플러스 4.5.1 (Mediacybernetics, Silver Spring, MD)을 사용하여 UV-광선 및 기준선 및 그 후의 24, 48 및 72 시간에서의 상 대비 하에서 기록하였다.

[0105] 세포제거된 ECM은 세포 생존능력, 부착 및 증식에 적합하였다. 접종된 mECMs는 ECM 골격에 융합하고, 세포 접종의 72 시간 이내에 매트릭스를 침범하기 시작하였다.

[0106] 실시예 7 - 세포제거된 기관의 평가

[0107] SDS 세포제거된 랫트 심장의 대동맥판 적격성 및 관상혈관상의 무결성 (integrity)은 2% 에반스 블루 염료에 의한 랑겐도르프 관류에 의해서 평가되었다. 염료에 의한 좌심실 충전은 관찰되지 않았으며, 이는 온전한 대동맥판을 나타낸다. 육안으로, 제4 분기점까지 관상동맥의 충전은 염료 누출의 징후가 없이 확인되었다. 그 후에, 조직 절편에서 크고 ($150 \mu\text{m}$) 작은 ($20 \mu\text{m}$) 동맥 및 정맥의 관류는 에반스 블루-염색된 혈관 기저막의 적색 형광에 의해서 확인되었다.

[0108] 주요 심장 ECM 성분의 유지를 확인하기 위해서, SDS 세포제거된 ECM 골격의 면역형광염색이 수행되었다. 이것은 콜라겐 I 및 III, 피브로넥틴 및 라미닌과 같은 주요 심장 ECM 성분의 존재를 확인하였지만, 심장 마이오신 중쇄 또는 근절성 (sarcomeric) 알파 액틴을 포함하는 보유했던 온전한 핵 또는 수축성 요소의 증거는 나타나지 않았다.

[0109] SDS 세포제거된 심장 ECM의 주사전자현미경 사진 (SEM)은 세포 섬유 배향 및 조성이 전체 조직 두께에 걸친 세포의 부재와 함께 대동맥벽 및 대동맥판 소편 (leaflet) 내에서 보존되었다. 세포제거된 좌 및 우 심실벽은 ECM 섬유 조성 (짜임, 지주, 코일 등) 및 배향을 유지하였으며, 한편으로 근섬유는 완전히 제거되었다. 양측의 심실의 유지된 ECM 내에서는 내피 또는 평활근 세포가 없는 상이한 직경의 온전한 혈관 기저막이 관찰되었다. 더구나, 온전한 심외막 기저막 아래에서 밀집된 심외막 섬유의 얇은 층이 유지되었다.

[0110] 세포제거된 심장조직의 기계적 특성을 평가하기 위해서, 이축 시험을 수행하고, 심장조직 조작에서 인공적 ECM 골격으로 빈번하게 사용되는 피브린 겔과 비교하였다. 정상적인 랫트 심실 및 세포제거된 샘플은 응력-변형률 거동에 관해서 매우 이방성이었다. 반대로, 피브린 겔 샘플 내에서 응력-변형률 특성은 두 가지 주된 방향 사이에서 극도로 유사하였다. 응력-변형률 거동의 방향적 의존성은 정상적인 랫트 심실 및 세포제거된 군 내의 모든 샘플에 존재하였으며, 응력-변형률 특성의 이방성 성질은 피브린 겔 군 내의 모든 샘플의 전형적인 것이다.

[0111] 이들 두 가지 군 사이, 및 심장의 주된 축들 사이의 응력-변형률 특성을 비교하기 위해서, 접선계수는 원주 및

세로 방향 둘 다에서 40% 변형률에서 계산되었다 (참조: 수학식에 관하여 실시예 5). 양방향 모두에서 세포제거된 샘플군은 정상적인 랫트 심실 및 피브린 겔 샘플군보다 상당히 더 높은 계수를 가졌음을 주목한다. 그러나, 정상적인 랫트 심실과 세포제거된 매트릭스 둘 다에 대한 두 가지 방향에서의 계수 사이에는 상당한 차이가 있었지만, 피브린 겔에 대해서는 그렇지 않았다.

[0112] 온전한 좌심실 조직의 경우에, 40% 변형률에서의 응력은 세로 방향에서 5 내지 14 kPa 사이에서, 원주 방향에서는 15 내지 24 kPa 사이에서 변화하였으며, 이것은 이전에 공개된 데이터와 일치한다. 랫트 심실 조직 및 세포제거된 랫트 심실 조직 둘 다에서, 원주 방향은 아마도 심장의 근섬유 방향에 기인하여 세로 방향보다 더 강직성이었다. 섬유 배향은 심장조직의 두께를 통해서 변화하지만, 대부분의 섬유는 원주 방향으로 배향되며, 따라서 이 방향은 더 강직성인 것으로 예상될 수 있다. 세포제거된 조직은 온전한 조직보다 상당히 더 강직성이었다. 이것은 또한, 세포의 매트릭스가 세포 그들 자체보다 더 강직성이기 때문에 예상될 수 있는 것이며, ECM과 세포의 조합은 단지 ECM 단독인 경우만큼 강직한 것 같지는 않을 수 있다. 세포제거된 조직의 접선계수의 값이 오히려 큰 것으로 보이지만, 이들은 정제된 엘라스틴 (약 600 kPa)에 대한 영계수 (Young's modulus)의 값보다 단지 약간 더 크고, 단일 콜라겐 섬유 (5 Mpa)의 영계수보다 작아서, 본 명세서에서 측정된 값은 이상적인 범위 내에 위치한다.

[0113] 실시예 8 - 그 밖의 다른 기관 또는 조직의 세포제거

[0114] 랫트 심장, 폐, 신장 및 간 이외에도 본 명세서에 기술된 관류 세포제거 프로토콜을 골격근, 췌장, 소장 및 대장, 식도, 위, 비장, 뇌, 척수 및 뼈에 적용함으로써 유사한 결과를 제공하였다.

[0115] 실시예 9 - 돼지 신장의 세포제거

[0116] 돼지 신장은 헤파린 처리된 수컷 동물로부터 분리되었다. 분리된 기관의 관류를 허용하기 위하여, 신장 동맥을 카놀라 삽입하고, 혈액을 15 분에 걸쳐서 PBS 관류시킴으로써 세척하였다. 탈이온수 중의 1% SDS 27 L에 의한 관류는 50-100 mmHg의 압력에서 35.5 시간 동안 수행하였다. 탈이온수 중의 1% 트리톤-X에 의한 관류를 개시하여 ECM 골격으로부터 SDS를 제거하였다. 그 후, 세포제거된 신장의 세척 및 완충은 항생제-함유 PBS로 120 시간 동안 관류시켜 세제를 제거하고 생체적합성 pH를 획득함으로써 수행되었다.

[0117] 기관 청정화 (clearing)는 관류를 개시한 지 2 시간 이내에 관찰되었다. 투명한 백색 색상이 관류액에서 12 시간에 우세하였다. 세포제거는 기관이 백색 반투명으로 되었을 때에 종료되었다.

[0118] 실시예 10 - 세포제거된 심장의 이식

[0119] F344 랫트로부터의 심장은 Ao 판에 대해서 원위인 대동맥을 카놀라 삽입하고, 폐동맥간의 왼쪽 가지 (분기점에서 원위) 및 하대정맥 (IVC)을 제외한 다른 모든 큰 혈관 및 폐혈관을 결찰함으로써 준비하였다. 세포제거는 랑겐도르프 역행성 관상동맥 관류 및 2 리터의 1% SDS를 12-16 시간에 걸쳐서 사용하여 달성되었다. 그 후, 심장을 30-40 분에 걸쳐서 35 ml의 1% 트리톤-X에 의해 복원시킨 다음에, 항생제 및 항진균제-함유 PBS로 72 시간 동안 세척하였다. IVC는 이식하기 전에 결찰하였다.

[0120] 세포제거된 심장의 수용을 위해서 큰 (380 내지 400 그람) RNU 랫트를 준비하였다. 무딘 각도의 모스키토 클램프 (blunt-angled mosquito clamp)를 숙주 동물의 IVC 및 복부 Ao 둘 다에 적용하여 접합 영역의 분리를 보장하였다. 세포제거된 심장의 대동맥을 8-0 실크 봉합사를 사용하여 신장 가지에 대해서 근위 및 하위의 숙주 복부 대동맥에 접합시켰다. 세포제거된 심장의 폐동맥간의 왼쪽 가지는 숙주 IVC의 가장 가까운 부위에 접합시켜 폐동맥간에 대한 물리적 응력을 최소화시켰다.

[0121] 두 가지 혈관을 모두 숙주 동물에 봉합시킨 후에, 클램프를 제거하고, 세포제거된 심장을 숙주 동물의 혈액으로 충전시켰다. 수용주 동물의 복부 대동맥 압력은 세포제거된 심장 및 대동맥에서 시각적으로 관찰되었다. 세포제거된 심장은 혈액에 의해서 확장되고 적색으로 되었다. 접합부위에서 출혈은 최소화였다. 헤파린을 클램프를 제거 (관류의 시작)한 지 3 분 후에 투여하였으며, 심장은 사진을 찍고 복부 내에 배치하여 접합부위에서 응력을 최소화시켰다. 복부를 멸균방식으로 폐쇄시키고, 동물은 회복에 대해서 모니터하였다. 이식-후 55 시간째에 동물을 안락사시키고, 세포제거된 심장은 관찰을 위해서 외이식하였다. 헤파린을 투여하지 않은 동물은 절개 및 평가시에 LV에서 큰 혈전을 나타내었다. 또한, 혈액은 심장의 우측 및 좌측 둘 다에서의 관상동맥에서 관찰되었다.

[0122] 그 밖의 다른 이식실험에서는, 두 가지 혈관 모두를 숙주 동물에 봉합시킨 후에 클램프를 제거하였으며, 세포제거된 심장을 숙주 동물의 혈액으로 충전시켰다. 수용주 동물의 복부 대동맥 압력은 세포제거된 심장 및 대동맥

에서 시각적으로 관찰되었다. 세포제거된 심장은 혈액에 의해서 확장되고 적색으로 되었으며, 접합부위에서 출혈은 최소화였다. 해파린은 클램프를 제거 (관류의 시작)한 지 3 분 후에 IP 주사에 의해서 투여하였다 (3000 IU). 심장은 사진을 찍고 복부 내에 배치하여 접합부위에서 응력을 최소화시켰다. 복부를 멸균방식으로 폐쇄시키고, 동물은 회복에 대해서 모니터하였다. 동물은 이식한 지 약 48 시간 후에 출혈로 사망한 것으로 나타났다. 이식시간은 현재 55 내지 70 분 범위 이내이다.

[0123] 항목 C. 재세포화

[0124] 실시예 1 - 심장 ECM 슬라이스 (slices)의 재세포화

[0125] 세포제거된 ECM의 생체적합성을 평가하기 위해서, 하나의 세포제거된 심장의 1 mm 두께의 슬라이스를 근원성 및 내피성 세포주와 함께 배양하였다. 2×10^5 랫트 골격 근아세포, C2C12 마우스 근아세포, 인간 체대 내피세포 (HUVECs), 및 소의 폐 내피세포 (BPEC)를 조직 절편 상에 접종하고, 7 일 동안 표준조건 하에서 공동-배양하였다. 근원성 세포를 ECM을 통해서 이동시키고 그 안에서 확대시켜 원래의 섬유 배향에 맞추어 정렬하였다. 이들 근원성 세포는 ECM 슬라이스의 증가된 증식 및 완전히 재-집단화된 큰 부분을 나타내었다. 내피성 세포주는 이식 표면 상에서 단일층을 형성하는 덜 침입성인 성장패턴을 나타내었다. 이들 조건 하에서 검출가능한 항증식효과는 없었다.

[0126] 실시예 2 - 관상동맥 관류에 의한 심장 ECM의 재세포화

[0127] 관상동맥 관류에 의해서 세포제거된 심장 ECM 상에 및 그 안에 재생성 세포를 접종하는 효율을 측정하기 위해서, 세포제거된 심장을 기관 챔버에 옮기고, 세포 배양조건 (5% CO₂, 60% 습도, 37°C) 하에서 산소화된 세포 배양매질로 연속적으로 관류시켰다. 120×10^6 PKH 표지된 HUVECs (50 ml의 내피세포 성장매질 내에 현탁됨)를 40 cm H₂O 관상동맥 관류압력에서 주입하였다. 관상동맥 유출물을 모아서 세포를 계수하였다. 그 후, 유출물을 재순환시키고, 다시 관류하여 최대수의 세포를 송달하였다. 재순환은 2 회 반복하였다. 세 번째 계대 후에, 약 90×10^6 세포가 심장 내에 보유되었다. 심장을 500 ml의 재순환성 산소화 내피세포 배양매질로 120 시간 동안 관류시켰다. 그 후, 심장을 분리하여 동결절단을 위해서 매립시켰다. HUVECs는 심장 전체에 걸쳐서 동맥 및 정맥 잔기로 한정되었지만, 아직 혈관의 ECM 전체를 통해서 완전하게 분산되지는 않았다.

[0128] 실시예 3 - 신생아 랫트 심장세포에 의한 세포제거된 랫트 심장의 재세포화

[0129] 랫트 신생아 심장세포의 분리 및 제조. 제1일에 1-3일된 8 내지 10 마리의 SPF 피서 (Fisher)-344 신생아 새끼를 5% 흡입 이소플루란 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL)로 진정시키고, 70% EtOH를 스프레이하고, 빠른 흉골절개술을 멸균방식으로 수행하였다. 심장을 절제하여 즉시, 신생아 심근세포 분리 시스템 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)의 시약 #1인 HBSS를 함유하는 얼음 상의 50 ml 코니칼 튜브 (conical tube) 내에 배치시켰다. 상등액을 제거하고, 전체 심장을 냉 HBSS로 격렬하게 소용돌이를 일으켜서 한번 세척하였다. 심장을 5 ml 냉 HBSS를 함유하는 100 mm 배양접시에 옮기고, 결합조직을 분리하고, 나머지 조직을 < 1 mm 조각으로 잘게 썰었다. 추가의 HBSS를 첨가하여 총 플레이트 용적을 9 ml로 만들고, 여기에 1 ml 트립신 (시약 #2, Worthington kit)을 첨가하여 50 µg/ml의 최종 농도를 제공하였다. 플레이트를 5°C 냉각기에서 밤새 배양하였다.

[0130] 제2일에, 플레이트를 냉각기로부터 꺼내어 얼음 상의 멸균 후드 내에 배치시켰다. 조직 및 트립신-함유 완충액을 광구 파이펫을 사용하여 얼음 상의 50 ml 코니칼 튜브에 옮겼다. 트립신 억제제 (시약 #3)를 1 ml HBSS (시약 1)로 재구성하고, 50 ml 코니칼 튜브에 첨가하여 부드럽게 혼합시켰다. 액체의 표면 위에 공기를 통과시킴으로써 조직을 60-90 초 동안 산소화시켰다. 그 후, 조직을 37°C로 가온하고, 5 ml 레이보비츠 (Leibovitz) L-15로 재구성된 콜라게나제 (300 유닛/ml)를 서서히 첨가하였다. 조직을 가온된 (37°C) 진탕 수조 내에 45 분 동안 배치시켰다. 그 다음에, 조직을 10 ml 파이펫을 사용하여 10 회 적정하여 세포 (초당 3 mls)를 방출시킨 다음에, 0.22 µm 필터를 통해서 여과하였다. 조직을 추가로 5 mls의 L-15 배지로 세척하고, 이차로 적정하고, 동일한 50 ml 코니칼 튜브에 수집하였다. 그 후, 세포의 용액을 실온에서 20 분 동안 배양하고, 50×g에서 5 분 동안 회전시켜 세포를 펠렛화시켰다. 상등액을 조심해서 제거하고, 세포를 신생아-심근세포 배지 (Neonatal-Cardiomyocyte Media)를 사용하여 원하는 용적으로 재현탁시켰다.

[0131] 배지 및 용액. 모든 배지는 멸균 여과하여 5°C 냉각기 중의 암소에서 저장하였다. 워팅톤 분리키트 (Worthington Isolation Kit)는 배양을 위해서 제시된 배지인 레이보비츠 L-15를 함유한다. 이 배지는 단지 조

직처리의 제2일에 사용되었다. 플레이팅 (plating)을 위해서는, 본 명세서에 기술된 대용 칼슘-함유 배지가 사용되었다. 워팅톤 레이보비츠 L-15 배지: 레이보비츠 배지 분말을 1 L 세포-배양 등급의 물을 사용하여 재구성하였다. 레이보비츠 L-15 배지는 140 mg/ml CaCl₂, 93.68 mg/ml MgCl₂, 및 97.67 mg/ml MgSO₄를 함유한다. 신생아-심근세포 배지: 이스코브의 변형된 둘베코 배지 (Gibco, Cat. No. 12440-053)에 10% 소태자혈청 (Hyclone), 100 U/ml 페니실린-G (Gibco), 100 U/ml 스트렙토마이신 (Gibco), 2 mmol/L L-글루타민 (Invitrogen), 및 0.1 mmol/L 2-머캅토에탄올 (Gibco, Cat. No. 21985-023)을 보충하고, 사용하기 전에 멸균 여과하였다. 필요에 따라서 암포테리신-B를 첨가하였다 (0.25 µg/ml 최종 농도). 이 배지를 1.2 mM CaCl₂ (Fisher Scientific, Cat. No. C614-500) 및 0.8 mM MgCl₂ (Sigma, Cat. No. M-0250)로 강화시켰다.

[0132] 재세포화의 시험관내 배양 분석. 생체인공 (bioartificial) 심장을 생성시키는데 관한 단계로서, 분리된 ECM을 신생아 심장-유래 세포로 재세포화하였다. 완전하게 세포제거된 심장 (본 명세서에 기술된 바와 같이 만들어짐)을 50×10^6 개의 신선하게 분리된 랫트 신생아 심근세포, 섬유세포, 내피 및 평활근 세포와 함께 주입하였다. 그 후, 심장조직을 슬라이스하고, 이 슬라이스를 시험관내에서 배양하여 세포제거된 ECM의 생체적합성, 및 심근환 (myocardium ring)으로 진화하는 생성된 제작물의 능력을 시험하였다.

[0133] 생성된 환 내에서의 최소 수축은 24 시간 후에 현미경적으로 관찰되었으며, 이것은 이식된 세포가 세포제거된 ECM에 부착 및 생착될 수 있었음을 나타내는 것이다. 현미경적으로, 세포는 ECM 섬유 방향을 따라서 배향되었다. 면역형광 염색은 심장 마이오신 중쇄를 발현하는 심근세포의 생존 및 생착을 확인하였다. 4일 이내에, 수축성 세포 패치의 클러스터 (cluster)가 세포제거된 매트릭스 상에서 관찰되었으며, 이것은 제8일까지 동시에 수축하는 조직환 (tissue rings)으로 진전되었다.

[0134] 제10일에, 이들 환을 두 개의 봉 (rods) 사이에 장착하여 상이한 전부하 조건하에서 수축력을 측정하였다. 이들 환은 4 Hz의 주파수까지 전기적으로 페이스팅되고, 0.65 g 이하의 전부하 하에서 3 mM 이하의 수축력을 발생할 수 있었다. 따라서, 이러한 재세포화의 시험관내 조직배양 방법에 의해서, 인공적 ECM 작제물을 사용하여 최적화된 조작된 심장 조직환에 의해서 생성되는 것과 동등하게 효과적인 힘을 생성하는 수축성 조직이 획득되었다.

[0135] 관류에 의한 세포제거된 심장의 재세포화. 재세포화된 (50×10^6 개의 신선하게 분리된 랫트 신생아 심근세포, 섬유세포, 내피 및 평활근 세포) 골격을, 멸균 심장조직 배양조건 (5% CO₂, 60% H₂O, 37°C) 하에서 점진적으로 증가하는 전부하 및 후부하 (제1일: 전부하 4-12 mmHg, 후부하 3-7 mmHg)를 갖는 박동성 좌심실 확장, 박동성 관상동맥 혈류 (제1일: 7 ml/분), 및 전기적 자극 (제2일: 1 Hz)을 포함하여 랫트 심장 생리학을 모사한 관류가 능한 생물반응기 (n=10) 내에 장착하였다. 관류된 기관 배양물을 1 내지 4 주일 동안 유지시켰다. 압력, 혈류 및 EKG는 전체 배양기간에 걸쳐서 매 15 분마다, 30 초 동안 기록하였다. 초기의 생체인공 심장의 비디오는 세포 접종한 후 4, 6 및 10일에 기록하였다.

[0136] 세포 접종한 후 제10일에, 좌심실 압력 (LVP)을 기록하기 위한 좌심실 내로의 압력 프로브의 삽입, 및 자극 주파수를 0.1 Hz에서 10 Hz로 서서히 증가시키고 페닐에프린 (PE)에 의한 약물학적 자극을 수행함에 따른 벽 운동의 비디오 기록을 포함한 더 면밀한 기능적 평가가 수행되었다. 재세포화된 심장은 LVP의 상응하는 증가에 의해 페이스팅된 수축에 따른 자발적 수축을 가지고 단일 페이스에 대해서 수축반응을 나타내었다. 단일 페이스 후에, 심장은 3 개의 자발적인 수축을 나타내었으며, 그 다음에 세동성 상태 (fibrillatory state)로 전환되었다. 자극된 수축과 유사하게, 자발적인 탈분극화는 LVP의 상응하는 증가, 및 아마도 발달성의 안정한 전도패턴 (developing stable conduction pattern)의 형성을 시사하는 기록가능한 QRS 컴플렉스를 야기하였다.

[0137] 일단 자극 주파수가 0.4 Hz로 증가하면, 각각의 유도된 수축 후에 평균 2 회의 자발적인 수축이 나타났으며; 1 Hz까지의 페이스팅 주파수에서는 단지 하나의 자발적 수축이 나타났고; 5 Hz의 페이스팅 주파수에서는 자발적인 수축이 나타나지 않았다. 최대 포착률 (capture rate)이 5Hz였으며, 이것은 성숙한 심장근육에 대한 250 ms의 불응기와 일치한다. 100 µM의 PE로 관류시킨 후에는 규칙적인 자발적 탈분극화가 1.7 Hz의 주파수에서 나타났으며, LVP의 상응하는 증가와 결부되었다.

[0138] 제10일째의 조직학적 분석은 좌심실 벽의 전체 두께 (0.5-1.2 mm)에 걸친 세포 분산 및 생착을 나타내었다. 심근세포는 심근섬유 방향에 맞추어 정렬되었으며, 성숙한 심장근육과 닮은 밀집된 조직화 이식물 및 발달성 심장근육과 유사한 덜 밀집된 미성숙 이식물의 영역을 형성하였다. 심장 마이오신 중쇄에 대한 면역형광 염색은 심근세포 표현형을 확인하였다. 높은 모세혈관 밀도는 모세혈관들 사이의 평균 간격을 약 20 µm로 하여 새로이 발달된 심장근육 전체에 걸쳐서 유지되었으며, 이것은 성숙한 랫트 심장근육에 대해서 보고된 것과 유사하다. 내피세포 표현형은 폰빌레브란트 인자 (vonWillebrand Factor; vWF)에 대한 면역형광 염색에 의해서

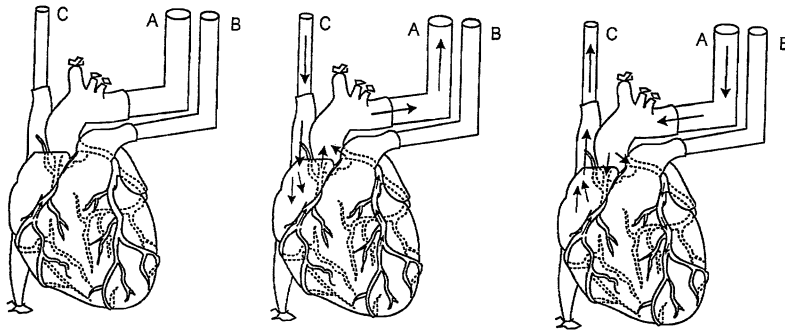
확인되었다. 세포 생존능력은 전체 이식물 두께에 걸쳐서 유지되었으며, 이는 관상동맥 관류를 통한 충분한 산소 및 영양소 공급을 시사하는 것이다.

[0139] 다른 구체예

[0140] 본 발명은 그의 상세한 설명과 함께 기술되어 있지만, 전술한 기술내용은 설명을 목적으로 하는 것이며, 첨부된 특허청구범위에 의해서 정의되는 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 다른 관점, 이점 및 변형은 이하의 특허청구범위의 범주 내에 포함된다.

도면

도면1



도면2

