(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0087773
(43) 공개일자 2013년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/60 (2006.01) *C12N 5/07* (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0008899
(22) 출원일자 2012년01월30일
심사청구일자 2013년05월29일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
대한민국(농촌진흥청장)
경기 수원시 권선구 서둔동 250번지
(72) 발명자
전옥
서울시 노원구 중계동 587번지 양지대림아파트 102동803호
최원익
경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 삼익아파트 123동 1501호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규팔

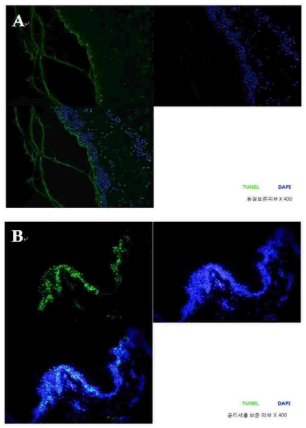
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **동결보존 이종 피부의 제조 방법 및 그로부터 제조된 동결보존 이종 피부**

(57) 요 약

본 발명은 이식용으로 사용되는 동결보존 이종 피부의 제조 방법 및 그로부터 제조된 동결보존 이종 피부에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 과초산(peracetic acid)을 이용하여 세포 활성을 유지하며 이식용 이종 피부에 존재하는 세균을 제거하고, 디메틸 설폭사이드, 동물세포배양 배지 및 우태아 혈청을 기본 성분으로 하여 이에 수크로스를 첨가함으로써 제조된 동결 보호제를 이용하여 이식용 이종 피부를 동결 처리하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

양형태

서울시 영등포구 양평동 금산오피스텔 802호

박희준

서울시 강남구 삼성동 33-24 멤버스 카운티 3차 301호

우제석

경기도 화성시 능동 푸른마을 두산위브 아파트 930동 503호

이휘철

경기도 수원시 영통구 영통동 벽적골 주공아파트 912동 806호

황성수

서울 송파 잠실2 잠실엘스아파트 124-2401

오건봉

경기 수원시 영통구 영통1동 황골마을1단지아파트 121-159 141동 1201호

임기순

경기 수원시 영통구 망포동 쌍용아파트 105-302

양병철

경기도 수원시 권선구 금곡동 LG빌리지 209-301

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ007793
부처명	농촌진흥청
연구사업명	동물바이오신약장기개발사업
연구과제명	GT-KO 및 FasL 형질전환돼지 조직에서의 이식관용 특성 규명
주관기관	국립축산과학원
연구기간	2010.06.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

i) 이종 피부를 적출하고;

ii) 적출된 이종 피부를 과초산 용액 및 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 으로 멸균하며;

iii) 디메틸 설폭사이드(DMSO), 동물세포배양 배지 및 우태아혈청을 혼합하여 기본용액을 제조하고;

iv) 상기 기본용액에 수크로스를 최종 농도가 20 내지 40 중량%가 되도록 용해하여 동결 보호제를 제조하며;

v) 상기 동결 보호제를 상기 과초산 처리된 이종 피부에 침투시키고;

vi) 상기 동결 보호제가 침투된 이종 피부를 controlled rate freezer에서 동결하는 것을 포함하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 적출된 이종 피부의 두께가 180 내지 500 ㎛인 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 과초산 용액의 농도가 0.5 내지 5%(w/v)인 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 에틸렌디아민테트라아세트산의 농도가 0.05 내지 0.5 몰인 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 디메틸 설폭사이드, 동물세포배양 배지 및 우태아 혈청의 혼합비가 중량 기준으로 1 : 3~5 : 4~6인 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 동물세포배양 배지가 MEM(Minimum Essential Media), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), RPMI 1640, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Media), Defined Keratinocyte-SFM(without BPE), Keratinocyte-SFN(with BPE), KnockOut D-MEM, AmnioMAX-II Complete Medium 및 AmnioMAX-C100 Complete Medium 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 수크로스의 최종 농도가 30 중량%인 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 동결 보호제를 적출된 이종 피부에 침투시키는 것이 4℃의 저온 반응기에서 6 시간 내지 24 시간 동안 침투시키는 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 동결 보호제가 침투된 이종 피부를 controlled rate freezer에서 분당 -1℃의 속도로 동결하는 것을 특징으로 하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조된 동결보존 이종 피부.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이식용으로 사용되는 동결보존 이종 피부의 제조 방법 및 그로부터 제조된 동결보존 이종 피부에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 과초산(peracetic acid)을 이용하여 세포 활성을 유지하며 이식용 이종 피부에 존재하는 세균을 제거하고, 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 동물세포배양 배지 및 우태아 혈청(fetal bovine serum)을 기본 성분으로 하여 이에 수크로스(sucrose)를 첨가함으로써 제조된 동결 보호제를 이용하여 이식용 이종 피부를 동결 처리하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 심한 화상, 외상 및 피부 질환 등으로 손상된 피부 조직을 재생시키기 위한 방법으로는 환자 자신의 피부를 이식하는 자가이식(autograft), 다른 사람의 피부를 이식하는 동종이식(homograft 또는 allograft), 동물의 피부를 이식하는 이종이식(heterograft 또는 xenograft)의 세 가지 방법이 있다. 이들 방법 중 자가이식이 가장 이상적이지만 화상부위가 광범위한 경우 조직을 확보할 수 있는 부위에 제한이 따르며 채취 부위가 새로운 상처부위로 남게 되는 어려움이 있다. 동종이식은 영구적인 생착보다는 상처 주변부의 세포의 이동과 치유를 돕는 역할을 한다. 미국과 중국에서는 사체에서 채취한 피부를 글리세롤 등에 냉동 보존하여 일시적인 보호제로서 사용하기도 하며, 사체의 피부에서 면역반응을 일으킬 수 있는 세포들을 완전히 제거한 탈표피화/탈세포화된 진피(de-epidermized dermis: alloderm, DED)의 형태로 만들어서 사용하기도 한다. 그러나 인체 피부 기증자의 공급이 부족하여 대안으로 동결건조시킨 돼지 피부(Alloask D)를 사용하기도 하는데 이 경우 안정적인 공급의 장점이 있지만, 초급성 거부반응(hyperacute rejection reaction) 등의 단점이 있다.

[0003] 따라서 생체적합성이 우수한 천연고분자 또는 합성고분자를 이용한 인공피부 제조를 위한 연구가 조직공학의 발전과 함께 급속히 진행되고 있으며, 피부조직 일부로부터 분리한 세포를 배양하여 손상 부위에 덮어주는 방법 등이 개발되어 임상에 적용되고 있다. 인공피부는 크게 창상피복제(wound dressing)라고 하는 일시적 피복형(temporary skin equivalent), 및 배양 피부 또는 체내이식용인 영구생착형(permanent skin equivalent)이라고 하는 두 가지로 크게 나뉠 수 있다. 생체이식용 생인공피부(bioartificial skin)는 보호막 기능은 물론 손상 조직의 재생에 필요한 성장인자와 세포외 간물질을 제공하여 신속한 창상 치유와 상흔의 감소 등 그 탁월한 효과가 입증되고 있다. 현재 개발 예정인 돼지 피부를 이용한 동결보존 이종 피부는 표피 조직과 진피 내 세포들이 모두 살아 있어 손상조직의 재생에 필요한 성장인자와 간물질을 제공하여 화상, 욕창, 외상, 성형, 난치성 궤양, 당뇨성 피부괴사 등에 임상 적용이 가장 현실적으로 근접한 재료이다. 또한, GT-KO(alpha 1,3-galactosyltransferase (GT) knockout)와 FasL transgenic 돼지를 이용할 경우 초급성거부반응이 없는 이종 진피조직의 제작도 향후 가능할 전망이다.

[0004] 이에 고가이면서 그 수급량에 한계가 있는 기증된 사체 피부를 이용하는 동종피부를 효과적으로 대체할 수 있는 동결보존 이종 피부의 개발에 대한 강한 요구가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서 본 발명은 이식용으로 적출된 이종 피부조직을 이상적이며 안전한 멸균용액으로 처리하여 이종 피부를 가공시 보다 효과적으로 표피층과 진피층 내의 세포의 안정화를 유지시키면서 다양한 종류의 미생물을 멸균을 하면서도 조직의 생물학적 성질의 변화를 최소화하고, 프로그램된 동결 과정을 통해 효율적으로 이식용 동결보존 이종 피부를 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것을 그 기술적인 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[0007] i) 이종 피부를 적출하고;

[0008] ii) 적출된 이종 피부를 과초산 용액 및 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA) 으로 멸균하며;

[0009] iii) 디메틸 설폭사이드(DMSO), 동물세포배양 배지 및 우태아혈청을 혼합하여 기본용액을 제조하고;

[0010] iv) 상기 기본용액에 수크로스를 최종 농도가 20 내지 40 중량%가 되도록 용해하여 동결 보호제를 제조하며;

[0011] v) 상기 동결 보호제를 상기 과초산 처리된 이종 피부에 침투시키고;

[0012] vi) 상기 동결 보호제가 침투된 이종 피부를 controlled rate freezer에서 동결하는 것을 포함하는 동결보존 이종 피부의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 방법에 의하여 제조된 동결보존 이종 피부를 제공한다.

[0014] 이하에서 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명에서 이종 피부의 적출은 예를 들면 피부절제기(dermatome)를 이용하여 적출할 수 있다. 이종 피부를 적출할 때 조직의 두께는 이식되는 부분에 생착(uptake)이 잘 될 수 있는 두께가 바람직하다. 본 발명에서 적출된 이종 피부의 두께는 바람직하게는 180 내지 500 ㎛이다. 피부 조직의 두께가 얇을수록 생착은 잘 되나 180 ㎛ 미만의 두께는 이식재로서의 인장강도를 나타내지 못할 수 있다. 피부 조직의 두께가 500 ㎛를 초과할 경우 이식 후에 생착이 잘 되지 않을 수 있다.

[0016] 본 발명에서는 이식용 이종 피부의 적출 후 털과 같은 오염원으로 인한 감염을 막기 위해 적출된 이종 피부를 과초산(peracetic acid) 용액 및 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)를 사용하여 세척함으로써 멸균한다. 본 발명에서 과초산 용액의 농도는 바람직하게는 0.5 내지 5%(w/v)이다. 과초산의 농도가 0.5% 미만일 경우 멸균 효과가 미약해질 수 있다. 과초산의 농도가 5%를 초과할 경우 멸균 능력은 뛰어날 수 있지만 세포의 활성을 크게 떨어뜨릴 수 있다. 본 발명에서 EDTA의 농도는 바람직하게는 0.05 내지 0.5 몰이다. EDTA의 농도가 0.05 몰 미만일 경우 그 효과가 미약해 질 수 있고, 0.5 몰을 초과할 경우 세포 활성에 문제가 있을 수 있다.

[0017] 본 발명에서 동결 보호제의 기본 용액으로는 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 동물세포배양 배지 및 우태아 혈청이 사용된다. 본 발명에서 디메틸 설폭사이드, 동물세포배양 배지 및 우태아 혈청은 바람직하게는 중량 기준으로 1 : 3~5 : 4~6의 혼합비로 사용된다. 본 발명에서 동물세포배양 배지의 혼합비가 3 미만이면 필수 영양물질의 결핍으로 인한 세포 사멸율의 증가 문제가 있을 수 있고, 5를 초과하면 동결 시 냉해로 인한 세포 사멸율의 증가 문제가 있을 수 있다. 본 발명에서 우태아 혈청의 혼합비가 4 미만이면 냉해 방지 혈장단백질의 결핍으로 인하여 동결시 냉해로 인한 문제가 있을 수 있고, 6을 초과하면 과도한 혈장 성분으로 인하여 세포 활성에 대한 문제가 있을 수 있다. 본 발명에서 디메틸 설폭사이드, 동물세포배양 배지 및 우태아 혈청은 가장 바람직하게는 중량 기준으로 1 : 4 : 5의 혼합비로 사용된다. 본 발명에서 동물세포배양 배지는 당 분야에 공지된 임의의 배지가 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 동물세포배양 배지는, 예를 들면 MEM(Minimum Essential Media), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), RPMI 1640, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Media), Defined Keratinocyte-SFM(without BPE), Keratinocyte-SFN(with BPE), KnockOut D-MEM, AmnioMAX-II Complete Medium 및 AmnioMAX-C100 Complete Medium 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서 동결 보호제는 상기 기본 용액에 수크로스(sucrose)를 최종 농도가 20 내지 40 중량%가 되도록 용해하여 제조된다. 본 발명에서 동결 보호제에 수크로스가 첨가되면 세포막과 세포막 단백질을 동결시 나타나는 얼음결정으로부터 보호하고 안정화 시키는 역할을 한다. 따라서 본 발명의 제조 방법에 의해 제조된 동결보존 이종 피부의 세포 생존율이 향상될 수 있고 수크로스, 우태아혈청 및 디메틸 설폭사이드의 이상적인 혼합비로 세포 생존율을 더욱 향상시킬 수 있다. 본 발명에서 동결 보호제에 수크로스가 20 중량% 미만으로 포함되면 세포 생존율 향상에 필요한 세포막과 막 단백질의 보호 및 안정화 등이 미약해질 수 있고, 40 중량%를 초과하여 포함되면 고농도의 당(sugar) 성분으로 인하여 세포 사멸율의 증가가 유발되는 문제가 있을 수 있다. 본 발명에서 동결 보호제는 가장 바람직하게는 상기 기본 용액에 수크로스를 최종 농도가 30 중량%가 되도록 용해함으로써 제조된다.

[0019] 본 발명에서 이종 피부에 동결 보호제를 침투시키는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 이루어 질 수 있고, 바람직하게는 저온 반응기에서 피부에 동결 보호제를 침투시킨다. 침투에 걸리는 시간은 피부 조직의 크기, 두께 등에 따라 다양할 수 있고, 예를 들면 4℃의 저온 반응기에서 약 6 시간 내지 24 시간 동안 침투시킬 수 있다.

[0020] 본 발명에서 동결 보호제가 침투된 이종 피부는 controlled rate freezer를 사용하여 동결한다. 동결시 controlled rate freezer를 사용하면 원하는 속도로 피부를 동결할 수 있다. 본 발명에서 controlled rate freezer를 사용하여 이종 피부를 동결하는 속도는 바람직하게는 분당 -0.1℃ 내지 -7℃, 가장 바람직하게는 분당 -1℃이다. 본 발명에서 동결을 시킬 경우 동결보호제가 침투된 피부의 온도와 controlled rate freezer 챔버의 온도는 같을 수가 없기 때문에 냉동 시 잠재용융열이 발생하는 구간에서부터 물분자의 움직임이 없는 온도인 -80℃까지 급속한 동결로 속도가 분당 10℃를 초과하여 잠재용융열을 조절하지 못하면 얼음결정현상으로 인한 조직의 파괴 문제가 있을 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에서는 고가이면서도 그 수급에 문제가 있는 기증된 사체 피부를 이용하는 동종 피부를 효과적으로 대체하여, 수급이 원활한 이종 피부를 사용하여 세포의 생존률이 높은 이식용 피부 조직을 동종 피부에 비하여 훨씬 저렴한 가격으로 제공함으로써 환자의 부담을 크게 줄일 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 과초산 농도에 따른 미생물 멸균률 및 세포 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 적출된 신선한 이종 피부 및 실시예의 동결보존 이종 피부를 6개월 보관 후 H&E 염색을 하고 광학 현미경으로 100배 확대하여 촬영한 사진이다. (A: 신선한 이종 피부, B: 실시예의 동결보존 이종 피부)

도 3은 실시예 및 비교예의 이종 피부를 TUNEL 염색 후 형광 현미경으로 100 배 확대하여 촬영한 사진이다. (A: 실시예, B: 비교예)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하에서 본 발명을 실시예로 보다 상세하게 설명한다. 다만, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0024] 초급성 거부반응(hyperacute rejection reaction)이 없는 돼지로 농업진흥청에서 제공받은 alpha 1,3-galactosyltransferase (GT) knockout 돼지를 사용하였다.

[0025] **실시예**

[0026] 초급성 거부반응이 없는 돼지 피부를 사용하여 다음의 단계에 따라 이식용 이종 피부를 제조하였다.

[0027] (1) 피부절제기(dermatome)를 사용하여 돼지로부터 피부를 300 ㎛의 두께로 적출하였다.

[0028] (2) 적출된 돼지 피부를 생리식염수로 깨끗이 세척하였다.

[0029] (3) 세척된 돼지 피부를 3% 과초산 및 0.1M EDTA 용액으로 멸균하였다.

[0030] (4) 멸균된 돼지 피부를 증류수로 깨끗이 세척하였다.

[0031] (5) 디메틸 설폭사이드(Sigma, 미국), DMEM(GIBCO, 미국) 및 우태아 혈청(GIBCO, 미국)을 1 : 4 : 5의 중량비로 혼합하였다.

[0032] (6) (5)의 기본 용액에 최종 농도가 30%가 되도록 수크로스를 넣고 용해시켜 동결 보호제를 만들었다.

[0033] (7) (6)의 동결 보호제에 (4)의 돼지피부를 넣어 4℃ 저온반응기에서 12시간 이상 교반하였다.

[0034] (8) 침투가 완료된 돼지피부와 50 ㎖의 동결 보호제를 에보 백(Evo bag)에 넣었다.

[0035] (9) 냉동 프로그램을 설정해 둔 Controlled rate freezer 준비하였다.

[0036] (10) (8)의 에보 백을 controlled rate freezer 안에 넣고 분당 -1℃의 속도로 -150℃까지 동결하였다.

[0037] **비교예**

[0038] 초급성 거부반응이 없는 돼지 피부를 사용하여 다음의 단계에 따라 50% 글리세롤 및 85% 글리세롤을 순차적으로 처리하여 글리세롤보존 피부를 준비하였다.

[0039] (1) 돼지 피부를 생리식염수로 깨끗이 세척하였다.

[0040] (2) 돼지 피부를 각각 5 × 10 cm^2의 크기로 절단하였다.

[0041] (3) 증류수로 희석시킨 50% 글리세롤에 돼지 피부를 72시간 동안 담갔다.

[0042] (4) (3)의 피부를 85% 글리세롤에 72시간 동안 담갔다.

[0043] **실험예 1**

[0044] 상기 실시예 단계 (1)의 적출된 돼지 피부를 증류수에 0.5 내지 20%의 과초산 용액 및 0.1M EDTA로 멸균하였다. 멸균된 돼지 피부를 멸균 증류수에 넣어 일정한 비율로 희석하여 흔들어 준 뒤, 용액의 일부를 취하여 LB 아가 배지에 도말한 다음 미생물을 배양하여 멸균률을 측정하였고, 세포 활성도 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0045] 도 1로부터 볼 수 있듯이, 과초산의 농도가 3% 이상인 경우 완전히 멸균되기는 하나, 과초산의 농도가 5%를 초과하는 경우에는 세포 활성이 크게 낮아지는 것을 알 수 있었다.

[0046] **실험예 2**

[0047] 상기 실시예 단계 (1)의 적출된 돼지 피부의 신선 조직 및 실시예에 따라 제조된 동결건조 이종 피부를 6개월 보관 후 H&E 염색을 하여 조직의 구조적 형태를 분석하였다.

[0048] H&E 염색법은 아래와 같이 실행하였다.

[0049] (1) 파라핀 블록을 4 ㎛ 두께로 박절한 후 건조시켜 파라핀 절편을 제작하였다.

[0050] (2) 탈파라핀 과정을 위해 자일렌에서 5분간 3번, 100% 에탄올에서 2분간 3번, 90% 에탄올에서 1분간 1번, 80% 에탄올에서 1분간 1번, 70% 에탄올에서 1분간 1번 반응시킨 후, 흐르는 물에 10분간 세척하였다.

[0051] (3) 헤마토자일린(hematoxylin) 염색액에 10분간 반응시킨 후 흐르는 물에 3분간 세척하고 에오신(eosin) 염색액에 10분간 반응시킨 후, 흐르는 물에 에오신 염색액이 나오지 않을 때까지 세척하였다. 70% 에탄올에 1초간 10번, 80% 에탄올에 1초간 10번, 90% 에탄올에 1초간 10번, 100% 에탄올에 1분간 2번, 자일렌에 3분간 3번 반응시킨 후, 마운팅 용액으로 마운팅하였다.

[0052] 상기 방법에 따라 H&E 염색을 하고 광학 현미경(Olympus BX51, H&E staining)으로 촬영하여 도 2에 나타내었다. 도 2로부터 볼 수 있듯이, 동결보존 조직의 세포사멸은 찾아 보기 힘들었으며, 신선 조직과 동결보존 조직 간의 조직학적 차이점은 발견할 수 없었다

[0053] **실험예 3**

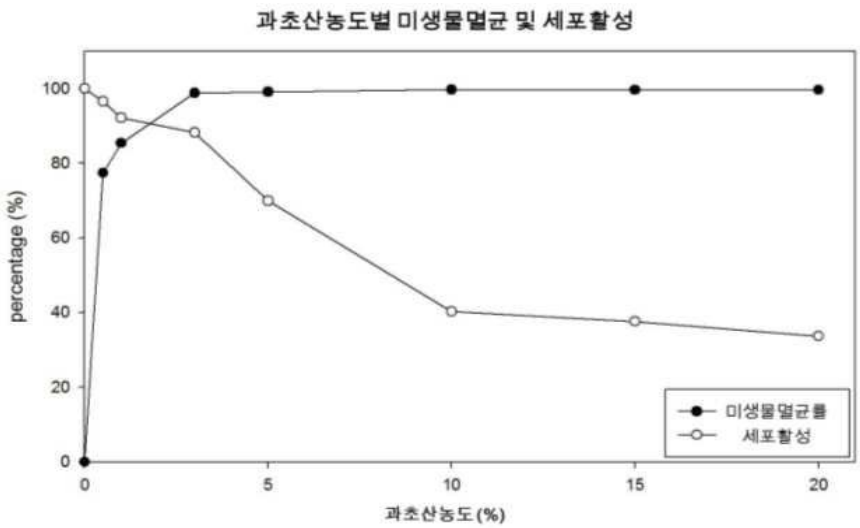
[0054] 상기 실시예 및 비교예에 따라 준비된 돼지 피부를 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick

end labeling) 분석법을 이용하여 분석하였다. TUNEL 분석은 In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein(Roche, 독일)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였고, 형광 마커는 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 사용하였다. 실시예 및 비교예의 피부를 형광현미경으로 촬영하여 도 3에 나타내었다.

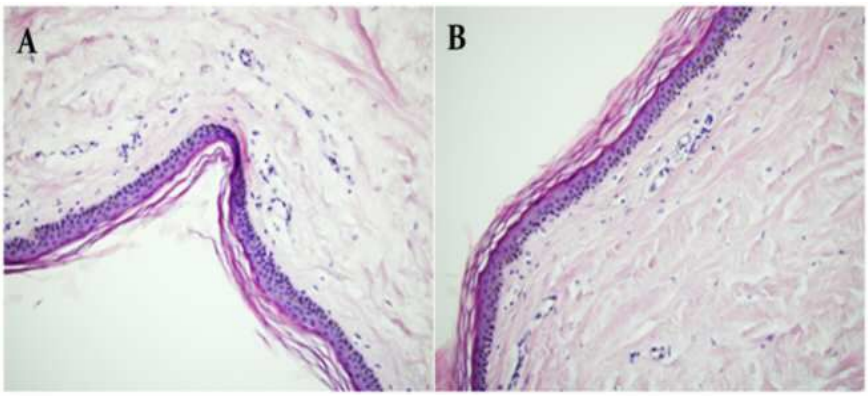
[0055] TUNEL 및 DAPI 염색 분석법을 이용하여 세포사멸률을 관찰한 결과 동결보존피부 조직에서는 동결로 인한 피해가 아닌 각질화 과정 중에 나타나는 세포사멸현상만을 보인 반면, 글리세롤 보존피부에서는 조직 전반적으로 세포의 사멸이 일어나는 것을 볼 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

